



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

HEPATITE C: DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO LABORATORIAL

Trabalho submetido por
Rute Alexandra Soalheira Valido Pereira
para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas

Junho de 2015



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

HEPATITE C: DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO LABORATORIAL

Trabalho submetido por
Rute Alexandra Soalheira Valido Pereira
para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas

Trabalho orientado por
Prof Doutora Perpétua Gomes

e coorientado por
Prof Doutora Manuela Caniça

junho de 2015

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho foi necessário o contributo de várias pessoas a quem agradeço:

- À Prof Doutora Manuela Caniça, Coordenadora do Mestrado em Análises Clínicas e Co-Orientadora da Monografia do Estágio, pelos seus ensinamentos académicos, e profissionais;
- À Prof Doutora Perpétua Gomes de forma especial pelo apoio e disponibilidade dispensada na elaboração deste trabalho;
- Ao Dr Rui Pimentel do Laboratório de Análises Clínicas Dr Joaquim Chaves por toda a disponibilidade, pela cedência de bibliografia, apoio incondicional, partilha e fonte de inesgotável conhecimento;
- Ao Dr Filipe Calinas do Centro Hospitalar de Lisboa Central (Serviço de Gastroenterologia do Hospital dos Capuchos) por me ter facultado informação extremamente útil e atualizada, e orientado numa fase inicial de elaboração do mesmo;
- Ao Dr Carlos Cardoso do Laboratório de Análises Clínicas Dr Joaquim Chaves pela cedência de bibliografia para complementar o trabalho relativamente à componente laboratorial;
- Ao Mestre José Coelho do Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves pelo apoio informático;
- Aos meus pais, por todo o apoio, confiança e encorajamento que me deram não apenas para a concretização deste trabalho, mas ao longo de toda a vida.

RESUMO

O vírus da hepatite C (VHC) encontra-se amplamente distribuído por todo o mundo infectando cerca de 150 milhões de pessoas, das quais 350 mil morrem em consequência da infeção. A incidência em Portugal está categorizada com um valor médio de cerca de 1,5%. O diagnóstico da infeção pelo VHC assenta na demonstração da presença dos anticorpos anti-VHC e de ARN-VHC. Contudo, raramente é efetuado numa fase precoce uma vez que para além de ser subclínica na maior parte dos doentes a seroconversão pode demorar até 9 meses depois da exposição ao vírus. Para além da pesquisa dos anticorpos específicos, do antígeno do core e da identificação e caracterização dos ácidos nucleicos do VHC (carga viral, genótipo/subtipo), o estudo dos doentes infetados no âmbito do diagnóstico, do prognóstico e da monitorização da evolução clínica e da resposta ao tratamento inclui a avaliação da função hepática, renal e tiroideia, assim como da histologia do fígado.

Pelo facto de ser extremamente agressiva e limitativa a terapêutica convencional de interferão peguilado associado à ribavirina foi complementada em 2011 por fármacos antivirais mais eficazes, que inibem diretamente a protease NS3/NS4 do vírus (telaprevir e boceprevir). Os esquemas de terapêutica tripla administrados e a sua complexidade não trouxeram benefícios significativos aos doentes, em particular no que diz respeito aos efeitos adversos. Felizmente fomos assistindo durante os anos de 2013 e 2014 ao desenvolvimento de inúmeras novas moléculas cujos alvos são as proteínas não estruturais do vírus, designadamente os complexos NS3/NS4 (simeprevir e faldaprevir) e NS4/NS5A (daclatasvir), e a NS5 (sofosbuvir). Atualmente está criada uma nova realidade clínica e epidemiológica, sustentada em grande parte pelo sucesso da intensa investigação e desenvolvimento da indústria farmacêutica que tem permitido aumentar o número de fármacos e as opções terapêuticas disponíveis; com isso, tem-se conseguido melhorar significativamente quer a qualidade de vida dos doentes, quer a eficácia do tratamento, com repercussões muito importantes na saúde pública pela redução do número de contatos infetantes na população (portadores). Em Portugal começam a ser dados os primeiros passos no sentido de serem introduzidos no Sistema Nacional de Saúde, nomeadamente o esquema triplo de IFN-PEG/RBV associado ao boceprevir ou telaprevir, e também sofosbuvir e simeprevir com resultados clínicos muito satisfatórios, permitindo estas novas terapêuticas a cura dos doentes em percentagens acima dos 90%.

Palavras – chave: anticorpos anti – VHC, carga viral RNA VHC, diagnóstico clínico, monitorização

ABSTRACT

The hepatitis C virus (HCV) is widely distributed across the globe, infecting approximately 150 million people, of which 350 thousand eventually die. Incidence in Portugal averages about 1.5%. The diagnosis of HCV infection is based on the presence of anti-HCV antibodies and HCV RNA. However, HCV infection is rarely diagnosed at an early stage, since it manifests as a subclinical disease in most patients and seroconversion may take up to 9 months to occur, following exposure to the virus. Besides laboratory tests aimed at detecting specific antibodies and the HCV core antigen, as well as assays aimed at identifying HCV nucleic acids (viral load, genotype/subtype), other tests usually performed on infected patients in connection with diagnosis, prognosis, clinical monitoring and response to treatment include hepatic, renal and thyroid function tests, as well as histological analysis of liver tissue.

Owing to its extreme aggressiveness and considerable limitations, conventional treatment with pegylated interferon and ribavirin was complemented in 2011 with more effective antiviral agents, which directly inhibit the NS3/NS4 protease (telaprevir and boceprevir). Nevertheless, these complex triple-therapy regimens failed to bring significant benefits to patients, particular regarding adverse events. Fortunately, countless new molecules that target non-structural HCV proteins, namely the NS3/NS4 (simeprevir and faldaprevir) and NS4/NS5A (daclatasvir) complexes, and NS5 (sofosbuvir), were developed over 2013-2014. This new clinical and epidemiological approach is largely the result of intensive pharmaceutical research and development, which has led to a considerable increase in the number of available drugs and treatment options. This has brought about significant improvements, not only in the quality of life of patients, but also in treatment effectiveness, a very relevant outcome in terms of public health, as the number of HCV carriers has decreased considerably. In Portugal, the first steps are being taken in order make these new treatment options available on the National Health Service, namely the triple-therapy regimen, i.e., PEG-IFN/RBV and boceprevir or telaprevir, as well as sofosbuvir and simeprevir. The clinical outcomes of these new therapies have been very satisfactory, with over 90% of patients achieving cure.

Keywords: anti-HCV antibodies, HCV RNA viral load, clinical diagnostic, monitoring

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras	8
Índice de Tabelas	8
Abreviaturas	9
1.INTRODUÇÃO	12
1.1 Caraterização e ciclo de replicação do vírus da hepatite C (VHC)	12
1.2 Variabilidade e diversidade genética	14
2. EPIDEMIOLOGIA	14
3. CARATERÍSTICAS CLINICOLABORATORIAIS DA INFEÇÃO .	17
PELO VHC	
3.1 Diagnóstico e estudo laboratorial dos doentes	19
3.2 Hepatite C aguda	28
3.3 Hepatite C crónica	30
3.3.1 Complicações	32
3.4 Coinfeção VHC/VIH	33
3.5 Coinfeção VHC/VHB	34
4. TERAPÊUTICA	36
4.1 Fármacos antivirais de ação direta	38
4.1.1 Inibidores da protease NS3/NS4A	38
4.1.1.1 Boceprevir (BOC)	39
4.1.1.2 Telaprevir (TLV)	40
4.1.1.3 Faldaprevir (FDV)	41
4.1.1.4 Simeprevir (SMV)	42
4.1.1.5 Asunaprevir	43
4.1.2 Outros inibidores da protease NS3/NS4A	44
4.1.3 Inibidores da polimerase NS5B	45
4.1.3.1 Inibidores análogos dos nucleósidos	45
4.1.3.1.1 Sofosbuvir (SOF)	45
4.1.3.2 Inibidores não análogos dos nucleósidos	47
4.1.3.2.1 Filibuvir (FLV)	47
4.1.3.2.2 Tegobuvir	48
4.1.3.2.3 Dasabuvir	48
4.1.4 Inibidores da polimerase NS5A	49

4.1.4.1 Ledispavir	49
4.1.4.2 Daclatasvir	49
4.2 Esquemas terapêuticos e sua monitorização laboratorial	51
5. FATORES GENÉTICOS DE PROGNÓSTICO	54
5.1 Polimorfismo do nucleótido simples próximo do gene <i>IL28B</i>	54
5.2 Determinação do polimorfismo <i>IL28B</i>	55
5.3 Interferão lambda (IFN- λ)	56
6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da organização do genoma do VHC e das poliproteínas processadas (estruturais e não estruturais)	13
Figura 2 – Representação clínicolaboratorial da hepatite C aguda	29
Figura 3 – Dinâmica da replicação do vírus da hepatite C na infecção aguda	30
Figura 4 – Representação clínico-laboratorial da hepatite C crônica	31
Figura 5 – Representação esquemática do ciclo de vida do VHC e alvos dos fármacos antivirais de ação direta	51
Figura 6 – Resumo das melhores combinações terapêuticas disponíveis atualmente	52
Figura 7 – Recomendações Europeias para o tratamento da hepatite C em 2014	53
Figura 8 - Dados da amostra para a detecção do sistema <i>IL28B</i>	56
Figura 9 - Papel potencial do polimorfismo de nucleótido simples (SNP) Interleucina-28B (<i>IL28B</i>) na resposta à terapêutica com IFN- α	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Genótipos e subtipos do VHC	14
Tabela 2 – Tendências epidemiológicas – implicações e desafios para os sistemas de saúde	17
Tabela 3 – Fatores de risco relacionado com a terapêutica	19
Tabela 4 – Interpretação dos resultados dos ensaios para o VHC e recomendações	20
Tabela 5 – GWAS entre o genótipo favorável <i>IL28B</i> e SVR na terapêutica de PEG-IFN/RBV	55

ABREVIATURAS

Aa	– Aminoácido
AAD	– Antivirais de ação direta
AFP	– Alfa feto-proteína
ALAT	– Alanina aminotransferase
ARN	– <i>Acid ribonucleic</i>
ARF	– <i>Alternate Reading Frame</i>
ASAT	– Aspartato Aminotransferase
AUC	– <i>Area Under Concentration Time Curve</i>
CDC	– <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CG	– Criglobulinémia
CHC	– Carcinoma Hepatocelular
DCs	– <i>Dendritic Cells</i>
EC₅₀	– Concentração eficaz
E1	– Glicoproteína 1 do invólucro
E2	– Glicoproteína 2 do invólucro
ETS	– <i>Early Treatment Success</i>
eRVR	– <i>Extended Rapid Virologic Response</i>
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
kDa	– <i>Kilodalton</i>
GGT	– Gama-glutamil transferase
GWAS	– <i>Genome Wide Association Studies</i>
GFR	– <i>Glomerular Filtration Ratio</i> (Taxa de Filtração Glomerular)
HAART	– <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HLA	– <i>Human Leucocyte Antigen</i>
HLA-C1	– <i>Human Leucocyte Antigen C group 1 (ligand)</i>
HVR1	– Região hipervariável 1
HVR2	– Região hipervariável 2
IFN	– Interferão
IFN-PEG	– Interferão peguilado
IFN-PEG/RBV	– Interferão peguilado associado a Ribavirina
IFN/RBV	– Interferão/Ribavirina
IFNAR1	– Receptor IFN tipo-1
IL28B	– <i>Interleuquin 28B</i>

IP – Inibidores da Protease

ISDR - *IFN-α sensitivity-determining region*

ISGs – *Interferon stimulated genes*

LLD – *Lower Limit of Detection* (<10-15IU/ml)

LLQ – *Lower Limit of Quantification*

KIR2DL3 – *Killer cell immunoglobulin-like receptor*

LI - *Lead-in* – 4 semanas de PEG-IFN+RBV antes da adição de PI

LDL – *Lipoprotein Low Density*

MAMA - *Mismatch Amplification Mutation Assay*

MAPKAPK3 – *Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3*

MEH – Manifestações extra-hepáticas

NVR – *Null virological response*

NI – *Nucleoside inhibitor*

ORF – *Opening Reading Frame*

p7- Proteína 7

PBMC – *Peripheral blood mononuclear cells*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RAVs – *Resistance variants aminoacids*

RBV – Ribavirina

RF- *Rheumatoid factor*

RGT – *Response Guided Therapy*

RVR – Resposta Viroológica Rápida com ARN-VHC negativo após 4 semanas de terapêutica

SNP – *Single Nucleotide Polimorfism*

SP – *Signal Peptidase*

SVR – Resposta Viroológica Sustentada (mantida) com ARN-VHC é negativo 6 meses após o fim da terapêutica

SVR 12 - Resposta Viroológica Sustentada (mantida) com ARN-VHC indetetável às 12 semanas de tratamento. *End point* (Ponto Final) aceite pela FDA para futuros ensaios

SVR 24 - Resposta Viroológica Sustentada (mantida) com ARN-VHC indetetável às 24 semanas de tratamento

Taq MAMA – *TaqMan Mismatch Amplification Mutation Assay*

TDM - *Transmembranar minimum domain*

TP – Tempo de Protrombina

TSH – Hormona Tirotrófina

T4T – Tiroxina total

VHB – Vírus da Hepatite B

VIH -Vírus da Imunodeficiência Humana

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização e ciclo de replicação do vírus da hepatite C (VHC)

O VHC foi identificado em 1989 por *Harvey J. Alter*. É um vírus de forma esférica (30-34 nm) com invólucro lipídico; contém um genoma de ARN de cadeia simples de polaridade positiva, constituído por cerca de 9600 nucleótidos, uma única ORF nas extremidades da qual (5' e 3') se encontram as regiões de tradução designadas por NTR (*Non Translated Regions*) que desempenham um papel importante nos processos de tradução da poliproteína do VHC e de replicação do ARN viral; pertence ao género *Hepacivirus* da família *Flaviviridae*. O VHC tem uma região estrutural constituída pelas proteínas da nucleocápside (C) e as glicoproteínas transmembranares do invólucro - E1 (gp35) e E2 (gp170) que desempenham um papel importante no processo de ligação e entrada nas células do hospedeiro, e outra não estrutural da qual fazem parte as proteínas p7 (proteína de membrana localizada no retículo endoplásmico), NS2 (protease), NS3 (serina protease), NS4A (cofator da atividade da NS3: NS3-NS4A), NS4B (proteína da membrana do ER) e NS5 que por sua vez se divide em NS5A (regula a replicação viral) e NS5B (ARN polimerase ARN dependente) que estão envolvidas na replicação do ARN e na morfogénese do vírus. As proteínas NS2 a NS5B da poliproteína do VHC são processadas por duas proteases, a NS2/NS3 (cisteína protease) que faz a clivagem da junção entre a NS2 e a NS3. A NS3 faz a clivagem das restantes proteínas funcionais (ver figura 1) (Chevaliez e Pawlotsky, 2006). A NS3, por desempenhar um papel importante na infeciosidade do VHC, e o domínio N-terminal da NS4B, por estar diretamente envolvido na replicação do VHC, têm sido alvos de investigação, quer para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais, quer inclusivamente, no caso particular da NS4B, para o de vacinas. A NS5B é uma ARN polimerase ARN dependente constituindo, tal como as anteriores, um alvo para o desenho de novas moléculas antivirais. De um modo semelhante a outras polimerases ARN dependentes está associada com a ocorrência de um número elevado de erros, da ordem de 10^3 nucleótidos/geração que, pelo facto do VHC não ter um mecanismo de “*proof-reading*”, não são corrigidos mantendo-se na estrutura dos genomas dos novos vírus (Rockstroh *et al.*, 2012).

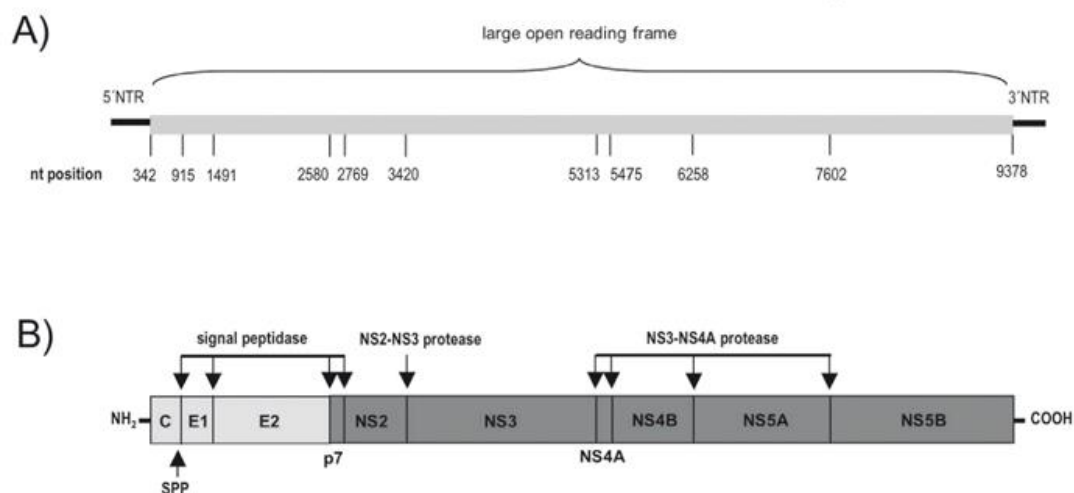


Figura 1 – Representação esquemática da organização do genoma do VHC e das poliproteínas processadas (estruturais e não estruturais)

A) Posições dos nucleótidos (corresponde a uma estirpe do subtipo 1a); B) Locais de clivagem da poliproteína precursora das proteínas estruturais e não estruturais do VHC (adaptado de Hepatology, 2014)

As glicoproteínas E1 e E2 formam um complexo que é responsável pela ancoragem das proteínas do invólucro à membrana citoplasmática das células do hospedeiro (hepatócitos). Os fatores do hospedeiro que intervêm como agentes facilitadores da entrada do vírus nos hepatócitos incluem o recetor *scavenger* SR-BI (CLA-1), as proteínas de junção claudina 1 (CLDN1) e ocludina, e as lectinas tipo CL-SIGN e DC-SIGN (Mauss *et al.*, 2014). A E2 pode igualmente inibir as funções das células *natural killer* diretamente por interação com a tetraspanina CD81 que foi o primeiro fator de entrada identificado na superfície das células hepáticas e o que está melhor caracterizado (Bertoletti, 2003). Na região codificante da E2 foram identificadas duas regiões hipervariáveis denominadas HVR1 e HVR2, cuja sequência de aminoácidos difere entre si em 80% dos aminoácidos. A elevada variabilidade dos HVRs, principalmente do E2-HVR1 reflete a enorme agilidade do VHC em escapar à pressão exercida pela ação neutralizante dos anticorpos específicos produzidos pelo sistema imune do hospedeiro (Rice, 2011). As partículas virais que se encontram na circulação sanguínea ligadas às lipoproteínas (VLDL e LDL) usam os glicosaminoglicanos e os recetores das LDL, para além dos que foram referidos anteriormente, como fatores de ligação inicial à superfície dos hepatócitos do hospedeiro. Numa segunda fase ocorre a fusão do invólucro viral com a membrana celular, seguida pela sua entrada nas células e ligação aos endossomas do citoplasma onde o genoma é libertado (Dubuisson *et al.*, 2008). Segue-se a tradução e processamento das proteínas virais, estruturais e não estruturais, assim como a

replicação do ARN-VHC e a formação e libertação dos novos viriões. O processo de tradução e a replicação do genoma viral são alvos muito importantes dos fármacos utilizados no tratamento dos doentes infetados pelo VHC (Rice, 2011).

1.2. Variabilidade e diversidade genética

O VHC caracteriza-se por apresentar uma grande variabilidade e diversidade genética; estas estão diretamente relacionadas com as mutações espontâneas verificadas no genoma viral em virtude quer da pressão resultante da resposta do sistema imunitário do hospedeiro, quer das que ocorrem em consequência dos erros induzidos pela polimerase ARN dependente, e são amplificadas pela elevada taxa de replicação do vírus (10^{12} viriões por 24h); as diferenças entre as sequências do ARN das estirpes que vão sendo formadas podem atingir valores da ordem dos 35%; estas variantes são designadas por *quasispecies* (Penin *et al.*, 2004; Dufour, 2011). Com base nas diferenças entre as suas sequências de ARN foram identificados 7 genótipos diferentes e mais de 90 subtipos; as variações que definem cada um deles são de cerca de 30-33% no primeiro caso e de 10% no segundo (ver tabela 1) (Dufour, 2011).

Tabela 1 – Genótipos e subtipos do VHC

Genótipos	Subtipos
1	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m
2	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r
3	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l
4	a, b, c, d, e, f, g, h, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u
5	a
6	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u
7 (ancestral)	a

2. EPIDEMIOLOGIA

O vírus da hepatite C está distribuído de forma bastante heterogénea a nível mundial. Esta variabilidade da prevalência inter-regional da infeção deve-se não só às diferenças

nos comportamentos de risco e das condições sanitárias das populações, mas também dos procedimentos de medida laboratoriais disponíveis para efetuar o seu diagnóstico, dos sistemas de vigilância epidemiológica implementados e das metodologias utilizadas para a obtenção dos dados estatísticos e a determinação dos resultados (exemplos: taxas de incidência, prevalência, morbidade e mortalidade). Estima-se que a nível mundial existam entre 130 e 170 milhões de pessoas infetadas pelo VHC, o que corresponde a cerca 3% da população mundial. Anualmente são registados 3 a 4 milhões de novos casos, e mais de 350000 pessoas morrem todos os anos em consequência da infeção, principalmente por complicações da cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular. As taxas de mortalidade são agravadas pelas comorbilidades que estão presentes em 30 a 40% dos doentes como, por exemplo, a doença da adição, quer de drogas administradas por via endovenosa, quer resultante do consumo excessivo de álcool (> 50g/24h), esteatose hepática, diabetes mellitus, doença renal, neoplasias das células linfóides, doenças autoimunes, crioglobulinemia mista e imunodeficiências (WHO, 2003; CDC, 1998; Boesecke, Wedenmeyer, Rockstroh, 2012; Gentile *et al.*, 2014). A prevalência da infeção pelo VHC é classificada em 3 categorias: elevada quando é superior a 3,5%, intermédia entre 1,5-3,5% e baixa quando é inferior a 1,5%. (Hanafiah *et al.*, 2013). Na Europa o número de casos diagnosticados varia entre 0,4% e 3,5%, apresentando uma grande variação geográfica com taxas mais elevadas nas regiões do Sul e do Leste em relação às restantes. A prevalência em Portugal enquadra-se na categoria intermédia (Cornberg *et al.*, 2011; Hanafiah *et al.*, 2013). À escala global o genótipo 1 é o mais prevalente, sendo o subtipo 1b mais frequente na Europa e o 1a nos E.U.A., imediatamente seguido pelos genótipos 2 e 3, que também são os que têm sido identificados em maior número na Península Ibérica e na Alemanha. O genótipo 4 é mais frequente no Egito, o genótipo 5 na África do Sul e o genótipo 6 no Sudoeste Asiático (Kamili *et al.*, 2012). O genótipo 7 foi identificado no Canadá e na Bélgica em doentes que tinham estado em regiões da África Central (Antaki *et al.*, 2010). Os subtipos 1a, 1b e 3a são os que têm sido identificados com maior frequência nos doentes adictos que usam a via parentérica (endovenosa); a prevalência relativamente elevada do subtipo 3a e do genótipo 4 está relacionada com as infeções iatrogénicas adquiridas antes de 1990 (Hanafiah *et al.*, 2013).

A principal via de transmissão do VHC é a parentérica (“contato sangue-sangue”), sendo a reutilização de seringas e agulhas, principalmente pelos indivíduos com doença da adição, o fator responsável pela maior parte das infeções. Também faz parte do grupo

de causas associadas a uma elevada taxa de transmissão do vírus a iatrogénica secundária às transfusões de sangue e dos seus derivados, não rastreados ou rastreados de forma deficiente (exemplos: ensaios imunoquímicos e de biologia molecular), e a reutilização de dispositivos médicos invasivos contaminados (exemplos: endoscópios, cateteres, agulhas, seringas e sistemas de soros), principalmente até 1990, assim como o transplante de órgãos e a hemodiálise (infecção nosocomial). As situações referidas são responsáveis por mais de 70% das infeções crónicas nos países desenvolvidos. Embora com uma frequência menor, estão também referenciadas como causas de infeção, a transmissão perinatal que ocorre em cerca de 5% dos recém-nascidos de mães portadoras do VHC, as tatuagens, os *piercings* e as relações sexuais, sobretudo no contexto de comportamentos de risco em que a incidência das doenças sexualmente transmissíveis é elevada. Em relação a qualquer das causas referidas o risco de transmissão é diretamente proporcional à carga viral e à presença de coinfeção pelo VIH ou de outras situações clínicas que cursam com imunodeficiência (ver tabela 2). Apesar de tudo é importante referir que cerca de 10 a 40% dos doentes infetados pelo VHC não apresentam nenhum fator de risco conhecido identificável no âmbito da história clínica (WHO, 2003; Dufour, 2011; Hanafiah *et al.*, 2013).

Tabela 2 – Tendências epidemiológicas - implicações e desafios para os sistemas de saúde (adaptado de Hanafiah *et al.*, 2013)

Tendências Epidemiológicas	Implicações	Desafios Sanitários
Aumento da morbidade e da mortalidade relacionada com o VHC; ausência de diagnóstico da infecção.	Aumento da utilização dos cuidados de saúde.	Rastreio de todos os adultos nascidos entre 1945 e 1965; Acesso global à avaliação clínica e tratamento, incluindo o transplante hepático.
Aumento da incidência da infecção pelo VHC em jovens com doença da adição e que usam a via endovenosa.	Dificuldade em identificar os doentes por a infecção ser assintomática na maior parte dos casos; Coepidémico com o consumo de opiáceos; O aumento da prevalência nas mulheres jovens eleva o número de casos de infecção perinatal.	Melhoria da vigilância no âmbito da saúde pública; Acesso à terapêutica de substituição com metadona, à troca de seringas e aos programas de reabilitação da doença da adição; Acesso ao rastreio da infecção por VHC e VIH; Prevenção da infecção pelo VIH; Melhoria da identificação da transmissão perinatal.
Aumento da incidência da infecção pelo VHC nos homens VIH positivos que têm relações sexuais com outros homens.	Coepidémico com doenças sexualmente transmissíveis (DST) e com comportamentos adictos; Fibrose hepática acelerada nos doentes com coinfeção VIH/VHC.	Rastreio regular de VHC, VIH e DST (identificação e tratamento); Acesso aos programas de reabilitação da doença da adição; Diminuição dos comportamentos de risco; Acesso aos esquemas terapêuticos adequados com os fármacos mais recentes.

3. CARACTERÍSTICAS CLINICOLABORATORIAIS DA INFECÇÃO PELO VHC

A infecção pelo VHC tem um período de incubação que pode variar entre 2 e 20 semanas embora, na maior parte dos casos, seja de 6 a 10. Caracteriza-se por ser subclínica na maior parte dos doentes (cerca de 80% na infecção aguda e 60 a 80% na infecção crónica) e, nos restantes, a sintomatologia ter um início insidioso, cerca de 6 a 7 semanas depois da exposição ao vírus, e ser inespecífica podendo apresentar-se com fadiga, anorexia, mialgias, artralgias, desconforto abdominal vago, náuseas, vômitos ou febre, que precedem em cerca de 25% destes pacientes o aparecimento de icterícia (WHO, 2003;

Sarrazin, 2007; Boesecke e Rockstroh, 2011) Os dados mais importantes relacionados com a história natural da doença publicados na literatura são os que a seguir se descrevem: (WHO,2003; Dufour, 2011; Bertoletti, 2003; Coppola *et al.*, 2014):

- A infecção aguda resolve-se espontaneamente sem sequelas em cerca de 10 a 30% dos doentes mas nos restantes (70 a 90%) persiste por um período igual ou superior a 6 meses (infecção crónica); a percentagem de casos que evoluem para a cronicidade é menor nas crianças (50 a 60%) do que nos adultos.
- Os fatores que têm sido associados com taxas maiores de resolução espontânea da infecção aguda são os valores e as características funcionais dos linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) produzidos pelo hospedeiro em resposta ao VHC, e a presença de títulos elevados de anticorpos neutralizantes específicos para as proteínas estruturais do vírus, dos polimorfismos do gene *IL28B*, e dos alelos específicos HLA-DRB1 e DBQ1.
- A infecção crónica evolui ao fim de cerca de 20 a 30 anos, em 10 a 40% dos casos, para cirrose, aumentando muito o risco de insuficiência hepática (incidência anual de 5%); 1 a 5% dos doentes com cirrose vêm a desenvolver carcinoma hepatocelular.

O prognóstico da infecção pelo VHC e a resposta virológica à terapêutica (SRV) são condicionados por diversos fatores dos quais se destacam a carga viral, o genótipo responsável pela infecção (por exemplo o genótipo 1 e os genótipos 4, 5 e 6 são os que têm pior prognóstico; o genótipo 1a é o que tem maior risco de desenvolver resistência durante a terapêutica baseada em IP, quando comparado com o genótipo 1b porque o HCV genótipo 1a requer uma alteração de um único nucleótido *versus* 2 para HCV tipo 1b na posição 155 de forma a desenvolver resistência, e os genótipos 2 e 3 são os que têm melhor prognóstico). Incluem-se também como fatores de prognóstico o consumo de bebidas alcoólicas (na doença crónica mesmo que seja em quantidades moderadas), o género, a idade, a etnia (nos pacientes afro-americanos o atingimento de SVR (Resposta Virológica Mantida), com terapêutica de PEG-IFN/RBV é mais baixa que nos caucasianos), o funcionamento do sistema imunitário (celular e humoral), os polimorfismos relacionados com o gene da interleucina 28B (*IL28*), o grau de fibrose hepática e as comorbilidades. Na tabela 3 estão resumidos alguns fatores de prognóstico que permitem prever a resposta à terapêutica (SRV) (Dufour, 2011; Coppola *et al.*, 2014).

Tabela 3 – Fatores de risco relacionados com a resposta à terapêutica (adaptado de Dufour, 2011; Coppola *et al.*, 2014)

FATORES	FAVORÁVEIS	DESFAVORÁVEIS
Género	Feminino	Masculino
Idade (anos)	< 40	≥ 40
Carga viral mediana	< 3,5 x 10 ⁶ cópias/mL	> 3,5 x 10 ⁶ cópias/mL
Genótipo	2 e 3	1, 4, 5 e 6
Polimorfismo do nucleótido simples (SNP) relacionado com o gene <i>IL28B</i>	Genótipo CC	Genótipos CT e TT
Grau de fibrose hepática	Ausente ou apenas fibrose portal	Presença de setos (pontes) ou grave

3.1. Diagnóstico e estudo laboratorial dos doentes

De acordo com as *guidelines* da AASLD (*American Association for the Study of Liver Diseases*) e da IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) a presença do VHC deve ser rastreada periodicamente em todos os indivíduos que fazem parte de grupos ou de populações identificados como tendo um risco elevado de adquirir a infeção em função de fatores epidemiológicos como os que foram descritos anteriormente Recommendations for Testing, Managing and Testing Hepatitis C [disponível em (<http://www.hcvguidelines.org/node/63>) consulta em 2015-06-06].

O diagnóstico da infeção pelo VHC depende da demonstração da presença dos anticorpos específicos anti-VHC, que aparecem na maior parte dos doentes 2 a 8 semanas depois do início da infeção hepática (\pm 80%), embora em alguns casos a seroconversão só ocorra passados 6 (< 3%) ou 9 meses (raramente), e da virémia (ARN-VHC) que pode ser identificada alguns dias depois da exposição ao VHC (cerca de 1 semana), principalmente se forem utilizados métodos de biologia molecular qualitativos com baixos limites de deteção (exemplo: PCR em tempo real – cerca de 10 UI/mL ARN-VHC) (WHO, 2003). Na tabela 4 são referidos os ensaios laboratoriais utilizados

para efetuar o diagnóstico da infecção pelo VHC e a interpretação dos resultados obtidos, assim como as ações recomendadas relacionadas com cada um deles.

Tabela 4 - Interpretação dos resultados dos ensaios para o VHC e recomendações

[(adaptado de www.cdc.com) consulta em 2015.02.03]

Resultados dos ensaios	Interpretação	Recomendações
Anticorpos anti-VHC não reativos (negativos)	Anticorpos não detetados	Os resultados podem ser reportados como não reativos (negativos) sem ser necessário encetar outras ações; Se houver história compatível com exposição recente (últimos 6 meses) ao VHC deve ser pesquisado o ARN-VHC (nos pacientes imunocompetentes deve ser efetuada a pesquisa de anticorpos periodicamente para identificar uma possível seroconversão e nos imunocomprometidos a do ARN-VHC)
Anticorpos anti-VHC reativos (positivos)	Infeção presuntiva por VHC	Resultados reativos da serologia são compatíveis com infecção ativa, infecção passada resolvida ou falso resultado reativo; deve ser efetuada a pesquisa de ARN-VHC para confirmar a infecção.
Anticorpos anti-VHC reativos (positivos) + ARN-VHC detetado	Infeção ativa por VHC (confirmação)	Determinar a carga viral e o genótipo/subtipo para referenciar o doente a um centro especializado para receber os cuidados de saúde mais adequados.
Anticorpos anti-VHC reativos (positivos) + ARN-VHC não detetado	Não há infecção ativa por VHC	Na maior parte dos casos não são necessárias ações subsequentes; Se não se tratar de um falso resultado positivo, em determinadas situações, deve ser efetuada periodicamente a pesquisa de ARN-VHC

Contudo, o diagnóstico definitivo da infecção pelo VHC e a identificação dos doentes numa fase precoce da doença (infecção aguda), visando monitorizar a evolução clínica e poder instituir a terapêutica mais adequada em tempo oportuno de modo a diminuir o número de portadores, o risco de transmissão e o aparecimento ou a progressão das complicações, são prejudicados e, muitas vezes, impossibilitados por uma série de fatores dos quais se destacam (WHO, 2003; AASLD, 2015):

- Cerca de 80% dos doentes com infecção aguda são assintomáticos.

- Entre 10 a 40% dos doentes infetados pelo VHC não apresentam nenhum fator de risco conhecido identificável.
- Os anticorpos específicos da classe IgM caracterizam-se por serem intermitentes, só estarem presentes em 50 a 93% dos doentes com infeção aguda, persistindo durante cerca de 8 semanas, e poderem ser identificados em 50 a 70% das infeções crónicas, principalmente nas fases de reativação da replicação viral (por exemplo emergência de *quasispecies*) e nas exacerbações da doença hepática crónica; a sua presença e os seus títulos não têm qualquer relação com a carga viral, o genótipo/subtipo do VHC ou a atividade histológica da doença (necrose hepatocelular periportal e fibrose); a estas limitações no contexto do diagnóstico laboratorial acresce outra muito importante que também está relacionada com o facto do seu comportamento não seguir o padrão clássico das outras infeções virais e que tem a ver com a irregularidade na ordem do seu aparecimento em relação aos anticorpos da classe IgG (WHO, 2003; Bizollon, 2000; EASL, 2014):
- Os imunoensaios usados na pesquisa e na identificação dos anticorpos anti-VHC dão frequentemente falsos resultados negativos nos doentes hemodialisados, e nos que apresentam crioglobulinemia.
- Os imunoensaios usados na pesquisa do antígeno do core dão frequentemente falsos resultados negativos nos doentes imunocomprometidos.
- Os anticorpos maternos podem persistir no soro das crianças não infetadas até aos 18 meses de idade (deixam de ser detetáveis em 90% dos casos ao fim de 12 meses e em 100% dos casos ao fim de 18 meses) (WHO, 2003; Dufour, 2011).

Para além da pesquisa dos anticorpos específicos, do antígeno do core e dos ácidos nucleicos do VHC, com eventual determinação da carga viral, da caracterização do genótipo/subtipo e, também, da identificação de resistências aos fármacos administrados, o estudo dos doentes infetados no âmbito do diagnóstico, do prognóstico (estratificação do risco e monitorização da evolução clínica) e da terapêutica (identificar os doentes elegíveis, prever a sua eficácia e monitorizar a resposta ao tratamento), inclui a avaliação hematológica e da função hepática, renal e tiroideia, a serologia infecciosa e a biologia molecular no contexto das coinfeções, assim como a identificação de genes e de polimorfismos genéticos no hospedeiro: (CDC, 1998; Dufour, 2011).

a) Pesquisa dos anticorpos anti-VHC: os ensaios imunoquímicos de 3ª geração permitem identificar a presença de anticorpos específicos para diversos antígenos virais, designadamente do core, NS3, NS4 e NS5; têm uma sensibilidade de cerca

de 99%. Estes ensaios são de uma forma geral imunoenzimáticos, ou utilizam o princípio da eletroquimioluminescência ou quimioluminescência.

As causas mais frequentes de falsos resultados positivos estão relacionadas com a presença de anticorpos endógenos (anticorpos heterófilos e autoanticorpos, sobretudo nos doentes com hepatite crónica autoimune) e com a baixa prevalência da infeção, enquanto os falsos negativos são mais frequentes nos doentes durante o período correspondente à fase de janela, nos que fazem hemodiálise, nos imunocomprometidos (por exemplo: coinfeção pelo VIH e neoplasias hematológicas) e nos que têm crioglobulinemia (sequestro dos anticorpos específicos e dos antígenos virais no crioprecipitado). Os ensaios de *immunoblot* utilizam antígenos recombinantes e péptidos sintéticos; embora sejam mais específicos, a sua sensibilidade é inferior aos anteriores; têm o seu maior valor semiológico na confirmação serológica da infeção pelo VHC em doentes que apresentam resultados positivos para os anticorpos específicos e negativos para o ARN-VHC, e nos que fazem parte de populações cujas taxas de prevalência da infeção são baixas. Nenhum dos imunoenaios descritos permite diferenciar os resultados positivos falsos dos que correspondem aos doentes que recuperaram naturalmente de uma infeção aguda, que têm uma resposta virológica sustentada (mantida) ao tratamento, ou que têm uma infeção crónica cujos valores do ARN-VHC circulantes são inferiores aos limites de deteção (LoD) dos métodos de biologia molecular (negativos).

b) Pesquisa e quantificação do antígeno do core: os ensaios imunoquímicos disponíveis permitem identificar a sua presença 1 a 2 dias depois da viremia pelos ensaios de biologia molecular, cujo limite de deteção é 1,5pg/ml (aproximadamente 10000-50000IU/ml) de ARN-VHC; os falsos resultados negativos são frequentes nos doentes imunocomprometidos. Num estudo efetuado por Vermehren, (2012), foi demonstrado que a quantificação do antígeno do core do VHC pode ser uma alternativa à determinação da carga viral na monitorização da resposta ao tratamento antiviral; foi evidenciado que o valor do antígeno inferior ao LoD (resultados negativos) ao fim da 1ª semana de tratamento, tem um elevado valor preditivo positivo de uma resposta virológica rápida (RVR). Alguns autores têm sugerido que a pesquisa e quantificação do antígeno do core do VHC pode ser uma boa alternativa à carga viral (ARN-VHC), para identificar a presença de infeção ativa antes do início da terapêutica antiviral e para documentar a remissão

virológica completa (mantida) às 12 e às 24 semanas depois do tratamento ter terminado (Vermehren, 2012).

c) Ácidos nucleicos (VHC): os ensaios de biologia molecular são os métodos de referência para confirmar a presença de infecção pelo VHC assim como da remissão viral total espontânea ou induzida pela terapêutica; são utilizados também para determinar o genótipo/subtipo do VHC e a carga viral dos doentes, cujos resultados são muito importantes para estratificar o risco, identificar os pacientes elegíveis para tratamento, prever a sua eficácia e monitorizar a evolução clínica e a resposta ao tratamento. Os ensaios qualitativos são usados para identificar a presença de ARN-VHC (diagnóstico) e os quantitativos para monitorizar a resposta ao tratamento e confirmar a resolução da infecção espontânea ou induzida (SVR); a periodicidade das determinações depende do esquema terapêutico instituído e da sua eficácia; a monitorização da resposta à terapêutica é efetuada habitualmente às 4, 8, 12, 24 e 48 semanas de tratamento e, depois de ter terminado, às 12, 24 e 48 semanas independentemente da vigilância que deve ser mantida ao longo dos anos; devem permitir identificar todos os genótipos conhecidos com a mesma sensibilidade e especificidade, e ter um limite de deteção tão baixo quanto possível (exemplo: ≤ 10 UI/mL), como o que é conseguido, por exemplo, com as técnicas de PCR em tempo real. Os métodos quantitativos são utilizados para determinar a carga viral que deve ser efetuada com uma periodicidade bem definida em função do protocolo terapêutico, visando monitorizar e avaliar a sua eficácia (CDC, 1998; Dufour, 2011). Os ensaios de biologia molecular também são muito importantes para identificar e caracterizar as mutações de resistência (RAVs) presentes nas estirpes do VHC que infetam os doentes que não responderam à terapêutica ou que tiveram respostas parciais (exemplos: V36M, I170T, Q41R, F43S, S282T, T54S, Q80K/R/L, R155K, A156T/V e D168N/A/G/V/E/H/T; Q80K com D168V e Q80K com D168E) (Sarrazin, 2007).

O método mais comum para detetar estas variantes de resistência são a sequenciação baseada no DNA da população. O método permite obter a composição das sequências “major” presentes, mas é limitado na deteção das subpopulações mutantes virais “minor” que apresentam <20% a 25%. Com o desenvolvimento do PCR específico de alelos, a sequenciação do genoma simples e as tecnologias de sequenciação profunda, a deteção das variantes resistentes a drogas tornaram-se mais sensíveis com os *cutoff* de cerca de 0,1 a 1%. Melhorias à

sensibilidade do ensaio foram conseguidas por uniformizar a amplificação das *quasispecies* virais e o ruído de fundo das mutações geradas durante a amplificação e sequenciação do PCR. A sequenciação das amostras não é unicamente dependente do número de leituras obtido mas é também fortemente limitado pela quantidade do modelo viral na amplificação em RT-PCR. As amostras plasmáticas com cargas virais baixas permitem obter apenas resultados limitados para subpopulações mutantes. Outra limitação das tecnologias de sequenciação profunda está relacionada com erros gerados durante a amplificação e procedimento de PCR.

Este método foi o primeiro usado para detetar a emergência dos mutantes de NS3 num modelo de HCV infeccioso com hepatócitos quiméricos (de rato e humanos) (Svarovskaia *et al.*, 2012).

Outras metodologias igualmente usadas para a determinação de resistências são Taq MAMA (*TaqMan Mismatch Amplification Mutation Assay*) e pirosequenciação ultra-profunda (Qiao *et al.*, 2014). Num estudo de Fonseca-Coronado *et al.* (2011) em que foi usado o método de PCR MAMA a sensibilidade analítica foi de 10 a 20 cópias por reação e foram encontradas diversas mutações de VHC resistentes às drogas: V36A, R155S e A156V, T54A, V55A e A156T (Fonseca-Coronado *et al.*, 2011).

Os ensaios baseados em PCR em tempo real específicos de alelo (AS-PCR) também permitem detetar mutações (exemplo: NS5B e Y448H) quando presentes em valores muito baixos, em 0,5% em população e com HCV com genótipo tipo 1a ou 1b. É um método sensível para testar um grande número de amostras, fácil de usar e de baixo custo, mas limitado à deteção da mutação específica amplificada pelo *primer* específico de alelo (Bae *et al.*, 2011).

Adicionalmente estão a ser desenvolvidos estudos com o objetivo de validar proteases de NS3 sintetizadas de derivados de PCR por *Escherichia coli* S30, as quais serão úteis para monitorizar o desenvolvimento de resistências de IPs durante a terapêutica antivírica (Qiao *et al.*, 2014).

d) Avaliação hematológica: a avaliação das repercussões hematológicas (exemplos: anemia, leucopenia, neutropenia absoluta e trombocitopenia) decorrentes da infeção pelo VHC, das complicações e manifestações intra e extra-hepáticas, e do tratamento (exemplo: interferão peguilado, ribavirina, sofosbuvir, boceprevir e telaprevir), assim como a sua monitorização, são efetuadas principalmente pela determinação do hemograma e da contagem das plaquetas; no

contexto da estratificação do risco, a trombocitopenia para além de ser uma complicação é um marcador de prognóstico importante nos doentes com cirrose hepática (Dufour, 2011; Boesecke, 2012).

e) Avaliação da função hepática:

- **Aminotransferases:** a aspartato aminotransferase (ASAT) é uma enzima que se encontra amplamente distribuída no citoplasma e nas mitocôndrias das células de diversos órgãos e tecidos, em particular do músculo cardíaco, do músculo esquelético, dos hepatócitos e dos rins o que a torna menos específica do que a alanina aminotransferase (ALAT) como marcador de lesão hepatocelular uma vez que para além de ser exclusivamente citoplasmática, encontra-se predominantemente no fígado e em muito menor quantidade no rim, músculo esquelético e cardíaco. O aumento da sua atividade, independentemente do seu carácter flutuante, intermitente ou persistente, é um marcador de doença hepática ativa, está mais relacionado com a causa da lesão hepática do que com a sua gravidade e os seus valores são mais elevados nos doentes com anticorpos IgM anti-VHC do que naqueles que não apresentam esta classe de anticorpos específicos. A relação ASAT/ALAT nos doentes com hepatite é carateristicamente inferior a 1,0, mas quando na infeção crónica a fibrose aumenta e vai evoluindo para cirrose (sensibilidade de 32 a 83% e especificidade de 75 a 100%) ou há doença hepática alcoólica associada, mesmo que o consumo de álcool seja moderado ($> 10\text{g}/24\text{h}$), os seus valores começam a ser progressivamente superiores a 1,0; neste último caso um índice superior a 2,0 associado a um aumento da atividade da gama-glutamyltransferase superior a duas vezes o limite superior do intervalo de referência está presente em mais de 90% dos doentes (Dufour, 2011; Bizollon, 2000; WHO, 2003).

- **Gama-glutamyltransferase (GGT):** é uma enzima ligada às membranas, principalmente dos hepatócitos (canalículos biliares), é um marcador sensível de lesão hepatobiliar ou colestase tendo o seu maior valor semiológico no estudo dos doentes com estas patologias e na avaliação dos efeitos hepatotóxicos do álcool (Dufour, 2011; WHO, 2003).

- **Bilirrubina (total, direta e indireta):** têm o seu maior valor semiológico no diagnóstico diferencial das icterícias e no estudo das patologias hepatobiliares; na hepatite viral um valor superior a 15 mg/dL está relacionado com lesão hepática grave e associado a um risco elevado de desenvolvimento de

encefalopatia (Dufour, 2011; WHO, 2003). Cerca de 12% dos doentes tratados com simeprevir (primeiras semanas) ou com faldaprevir aparecem com icterícia por serem fármacos que inibem a UDP-glucuriltransferase (elevação da bilirrubina indireta) (Fried *et al.*, 2013; Zeuzem *et al.*, 2014).

- **Albumina:** embora seja um marcador biológico pouco sensível para avaliar a capacidade de síntese hepática, em virtude da enorme reserva funcional do fígado e do seu elevado tempo de vida médio (19 a 21 dias), é um indicador de cronicidade e um bom marcador quer da gravidade da insuficiência hepatocelular (descompensação), quer do prognóstico da cirrose; a diminuição da sua concentração é diretamente proporcional à progressão da cirrose (Dufour, 2011; WHO, 2003).

- **Tempo de protrombina (TP/INR):** é mais sensível do que a albumina para avaliar as alterações da capacidade de síntese hepática, porque os fatores da coagulação da via extrínseca que são sintetizados nos hepatócitos, têm um tempo de vida médio muito inferior; tem o seu maior valor semiológico na avaliação da gravidade da insuficiência hepatocelular e da colestase, sendo um dos marcadores de prognóstico mais importantes, cujos valores superiores a 4 segundos em relação ao limite correspondente do intervalo de referência estão associados com taxas de mortalidade mais elevadas (Dufour, 2011; WHO, 2003).

f) Avaliação da função renal: a avaliação das repercussões na função renal decorrentes da infeção pelo VHC, das manifestações extra-hepáticas (exemplo: glomerulonefrite), e do tratamento, assim como a sua monitorização, são efetuadas principalmente pela determinação da creatinina sérica, da taxa de filtração glomerular (GFR) e da concentração tanto das proteínas totais como da albumina na urina, e pelo exame sumário de urina (exemplo: identificação de microhematúria). Antes de ser iniciada a terapêutica com fármacos cuja excreção se faz predominantemente por via renal (exemplos: ribavirina e sofosbuvir), deve determinar-se a GFR dos doentes para ajustar as doses administradas em função dos seus valores (CDC, 1998; Fabrizi, Lunghi, Messa e Martin, 2008).

g) Avaliação da função tireoideia: nos doentes tratados com interferão peguilado (PEG-IFN) recomenda-se que a determinação da hTSH e da T4 livre seja efetuada com uma periodicidade semestral para identificar e monitorizar a disfunção tireoideia induzida por este fármaco (hipotireoidismo em 40-50% e hipertireoidismo em 10-30% dos doentes), cujas manifestações podem aparecer até 17 meses depois

do tratamento ter terminado; a incidência de disfunção tiroideia é maior nos doentes com doenças autoimunes desta glândula endócrina (exemplos: doença de Graves ou tiroidite de Hashimoto, sintomáticas ou assintomáticas), principalmente se os anticorpos antiperoxidase tiroideia (anti-TPO) estiverem presentes (Dufour, 2011; Dong, 2000).

h) Serologia infecciosa e biologia molecular no contexto das coinfeções: a determinação dos marcadores da infeção pelo VHB (AgHBs, AgHBe, AchBc, AchBe e AchBs) e, eventualmente, da pesquisa do ADN-VHB e, de acordo com os critérios clínicos, da pesquisa de anticorpos anti-VHD, do ARN-VHD e da sua genotipagem, assim como dos anticorpos anti-VIH e da pesquisa dos seus ácidos nucleicos, tem por objetivo identificar os doentes com coinfeções pelo VHB, isolada ou associada ao VHD, e pelo VIH, e monitorizar a evolução clínica e a resposta ao tratamento (Dufour, 2011; Wedemeyer, 2014).

As atuais recomendações para a monitorização da eficácia do tratamento (EASL, 2014) baseiam-se no ensaio de PCR em tempo-real com um baixo limite de deteção de <15IU/ml o qual deve ser usado para monitorizar os níveis de ARN-VHC durante e após a terapêutica (EASL, 2014).

É importante referir que em cerca de um terço dos doentes com coinfeção VHC/VHB os marcadores para o VHB podem ser negativos (exemplo: AgHBs) embora o ADN-VHB seja detetável (Boesecke, 2012).

i) Farmacogenética: identificação de polimorfismos genéticos e de genes nos doentes que condicionam o prognóstico da infeção e permitem prever a resposta ao tratamento (exemplos: polimorfismo do nucleótido simples - SNP próximo do gene da interleucina 28B – genótipo CC, CT e TT) (GWAS – *Genome Wide Association Studies*; Matsuura, Watanabe e Yasuhito, 2014).

Embora não haja uma padronização das determinações analíticas e sobretudo da periodicidade com que devem ser efetuadas no âmbito do estudo dos doentes com infeção pelo VHC, algumas sociedades científicas como a *European Association for the Study of the Liver Consensus Conference on Hepatitis C* e autores de diversos grupos de trabalho têm feito várias recomendações sobre este assunto, cujos exemplos se transcrevem:

- Nos doentes não tratados a determinação das aminotransferases (ALAT) e do hemograma devem ser efetuados com uma periodicidade semestral (Dufour, 2011).

- Nos doentes com hepatite crónica os marcadores de função hepática que podem indicar progressão para cirrose (exemplo: relação ASAT/ALAT, albumina, bilirrubina, tempo de protrombina/INR e contagem de plaquetas) devem ser determinados com uma periodicidade trimestral ou semestral (Dufour, 2011).
- Nos doentes com cirrose por infeção pelo VHC deve ser efetuado o doseamento da alfa-fetoproteína (AFP) e ecografia hepática com uma periodicidade semestral, a fim de identificar numa fase precoce o aparecimento de carcinoma hepatocelular (CHC), cuja incidência anual é inferior a 3% (Dufour, 2011; Boesecke, 2012); concentrações de AFP superiores a 400 µg/L ou a sua elevação progressiva ao longo do tempo são fortemente sugestivas de CHC (Boesecke, 2012).
- Nos doentes tratados com interferão e ribavirina a monitorização das suas ações acessórias e secundárias deve ser efetuada semanalmente durante o primeiro mês de tratamento e, depois deste período, com uma periodicidade regular em função da sua história clínica, com o objetivo de identificar o aparecimento de trombocitopenia e de disfunção tiroideia (interferão), assim como de anemia hemolítica (ribavirina) (Dufour, 2011).

3.2. Hepatite C aguda

A infeção pelo VHC que se resolve espontaneamente sem sequelas durante os primeiros 6 meses depois da exposição ao vírus – ARN-VHC não detetável e atividade das aminotransferases (exemplo: ALAT) dentro dos intervalos de referência, embora os anticorpos anti-VHC se mantenham positivos – define a hepatite C (HVC) aguda (ver figura 2) (WHO, 2003).

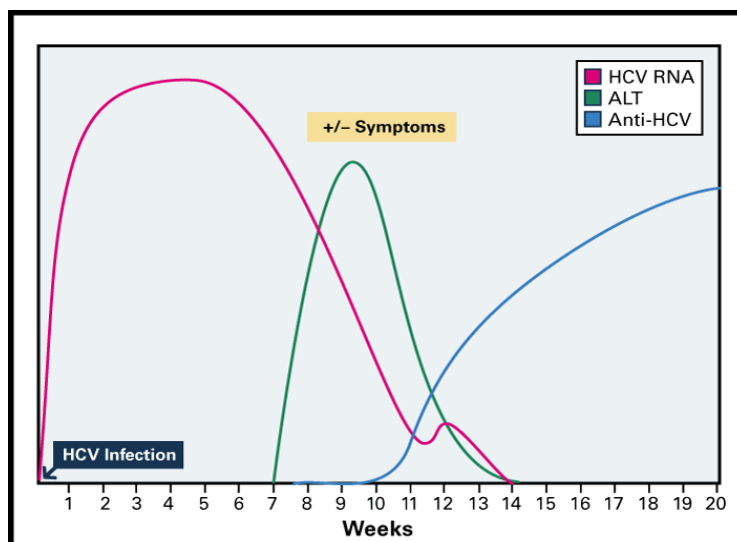


Figura 2 – Representação clínico-laboratorial da hepatite C aguda

[adaptado de (<http://depts.washington.edu/hepstudy/hepC/clindx/acute/discussion.html>) consulta em 2015-01-26]

O período entre a exposição ao VHC e o início dos sintomas, que ocorrem em menos de 20% dos doentes é de cerca de 6 a 8 semanas (podendo variar entre 5 e 12). O aumento da atividade das aminotransferases verifica-se geralmente 6 a 12 semanas depois da exposição ao vírus e os seus valores, embora na maior parte dos doentes tenham um padrão flutuante característico, tendem a ser 10 a 30 vezes superiores ao limite do intervalo de referência. A seroconversão ocorre em cerca de 80% dos pacientes entre 2 a 8 semanas depois do início da lesão hepática, sendo muito raros os casos em que os anticorpos anti-VHC surgem apenas 9 meses depois do início da infeção (WHO, 2003, 2014; Dufour, 2011; Boesecke, 2012; CDC, 1998).

Na VHC aguda a dinâmica (cinética) da carga viral observada na maior parte dos doentes pode ser dividida em 3 fases [ver figura 3]:

- Fase de pré-rampa ou de eclipse: compreende o período de duração desconhecida que decorre entre a exposição (início da infeção) e o momento em que o ARN-VHC passa a ser detetável e o tempo de duplicação da carga viral é inferior a 10,8h; em alguns doentes o baixo nível de viremia desta fase inicial, por vezes com períodos em que o ARN-VHC deixa de ser detetável (intermitente), à semelhança do que se observa frequentemente na fase terminal da infeção crónica, pode persistir durante dois meses (CDC, 1998).

- Fase de rampa: corresponde a um período cuja duração varia entre 8 a 10 dias e a carga viral duplica, pelo menos, a cada 10,8 horas.
- Fase de *plateau*: corresponde aos últimos dias da infecção aguda (cerca de 45 a 68); o período de transição da fase de rampa para esta última caracteriza-se pelo elevado nível de viremia.

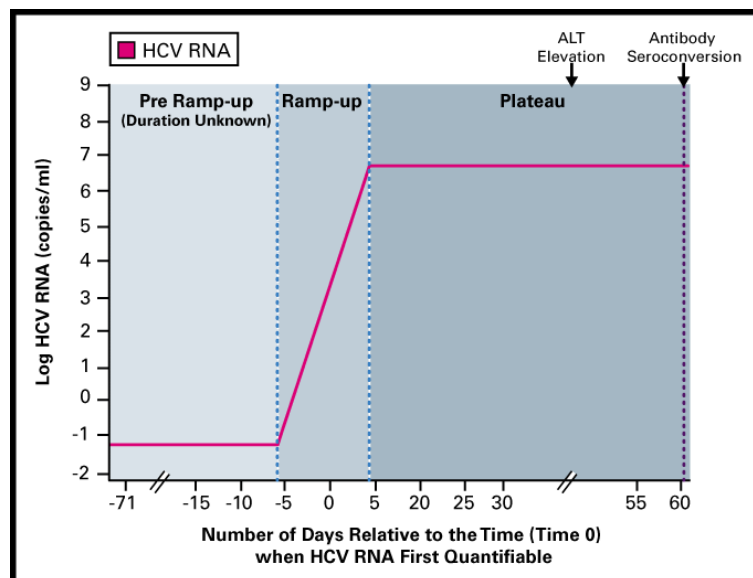


Figura 3 – Dinâmica da replicação do vírus da hepatite C na infecção aguda:

[adaptado de (<http://depts.washington.edu/hepstudy/hepC/clindx/acute/discussion.html>) consulta em 2015-01-26]

3.3 Hepatite C crónica

A infecção crónica pelo VHC constitui uma síndrome clínico-patológica complexa que se caracteriza por a sua evolução e progressão ser influenciada por múltiplos fatores, ter diferentes prognósticos e respostas ao tratamento, e apresentar vários estádios de lesões necrótico-inflamatórias e esclerosantes (fibrose) ao nível do fígado (WHO, 2003). O seu diagnóstico assenta nos seguintes critérios (CDC, 1998; Dufour, 2011; WHO, 2003; Boesecke, 2012; EASL, 2014):

- Infecção persistente (replicação viral) por um período superior a 6 meses, que acontece em 70 a 90% dos adultos e em 50 a 60% das crianças depois da exposição ao vírus, evidenciada por resultados histológicos (biópsia), laboratoriais ou ambos:

a) Histologia (método de referência): necrose hepatocelular periportal e inflamação hepática, acompanhadas frequentemente por vários graus de fibrose.

b) Laboratório: ARN-VHC detetável, acompanhado ou não por ALAT elevada, com padrão persistente ou intermitente, e presença de anticorpos anti-VHC por um período superior a 6 meses (15 a 20% dos doentes com anticorpos específicos positivos não têm viremia detetável; em todos os pacientes com anticorpos específicos positivos e valores da ALAT normais deve ser efetuada a pesquisa de ARN-VHC para identificar os doentes com infecção persistente, cuja viremia é intermitente) (ver figura 4).

Na infecção crónica a atividade das aminotransferases está dentro dos intervalos de referência em 15 a 20% dos doentes e elevada nos restantes, cujo padrão em 60 a 70% dos casos é intermitente, indicando doença hepática ativa; a correlação entre a atividade das aminotransferases e a histologia hepática é baixa; a maior parte dos doentes com valores normais da ALAT têm evidência histológica de hepatite crónica (biópsia), mas a reação inflamatória e a fibrose são geralmente ligeiras e o número de casos que progridem para cirrose também são menores do que os que têm valores elevados; os doentes com valores normais de ALAT não são elegíveis para efetuarem tratamento. A normalização das aminotransferases após a terapêutica com interferão nem sempre está associada à melhoria das lesões histológicas (CDC, 1998; Dufour, 2011; Boesecke, 2012).

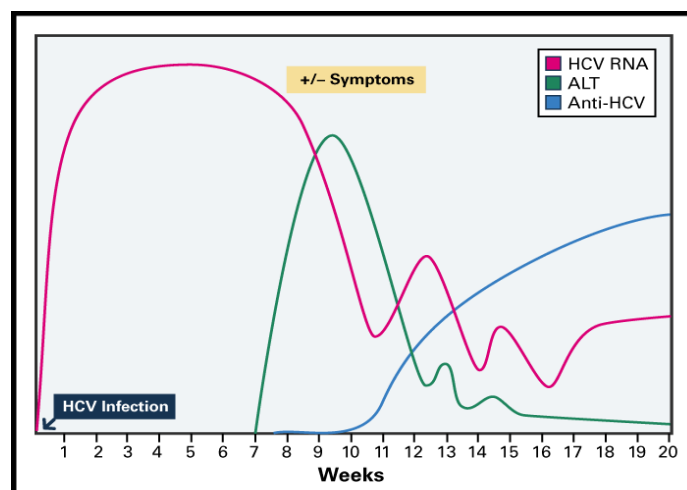


Figura 4 – Representação clínico-laboratorial da hepatite C crônica

adaptado de (<http://depts.washington.edu/hepstudy/hepC/clindx/acute/discussion.html>) consulta em 2015-01-26]

Os doentes com infeção crónica pelo VHC têm um risco elevado de vir a desenvolver manifestações extra-hepáticas (MEH); de acordo com os diferentes autores 30 a 60% destes indivíduos apresentam durante o curso da doença uma MEH, podendo constituir a única manifestação (Boesecke, 2012; Böhlig *et al.*, 2014). Pela sua importância clínica, pelas repercussões que têm no prognóstico e podem ter na seleção do esquema terapêutico mais adequado para cada caso, são dados alguns exemplos de MEH: (Boesecke, 2012).

- Crioglobulinemia mista tipo II ou, mais frequentemente, tipo III (afeta entre 10 a 15% dos doentes infetados; cerca de 15% vêm a desenvolver insuficiência renal crónica e a fazer hemodiálise).
- Glomerulonefrite membranoproliferativa, mesangioproliferativa ou membranosa que pode evoluir para insuficiência renal ou síndrome nefrótica graves (fator de prognóstico negativo).
- Doença autoimune da tiroideia.
- Resistência à insulina (avaliada pelo valor do HOMA-IR) e diabetes mellitus tipo II são fatores desfavoráveis de resposta à terapêutica.
- Deficiência de vitamina D (responsável pela progressão e agravamento da fibrose hepática).
- Purpura trombocitopénica imune.
- Anemia hemolítica autoimune (associada frequentemente à terapêutica dupla com PEG-IFN e ribavirina).
- Neoplasias das células linfóides (principalmente dos linfócitos B).

3.3.1 Complicações

As complicações da hepatite C ocorrem quase exclusivamente nos doentes que desenvolveram cirrose; a cirrose é muito difícil de diagnosticar clinicamente numa fase precoce da sua evolução, permanecendo assintomática, na maior parte dos casos, até aparecerem manifestações clínicas e laboratoriais associadas com a descompensação da função hepática (incidência de 5% por ano), designadamente hepatomegalia e/ou esplenomegalia, ascite, hemorragia digestiva alta (varizes esofágicas), encefalopatia, icterícia (hiperbilirrubinemia), hipoalbuminemia e trombocitopenia. O risco dos doentes com cirrose desenvolverem carcinoma hepatocelular (CHC) é inferior a 3% por ano. (Dufour, 2011; Boesecke, 2012). O consumo de álcool mesmo que seja em quantidades

moderadas (> 10g/24h) agrava a progressão da doença (acelera a fibrose hepática) (CDC, 1998).

A estratificação do risco e a avaliação do prognóstico dos doentes com cirrose hepática é feita atualmente através do *Score* MELD (*Model for End-Stage Liver Disease*) que veio substituir o modelo de *Child-Pugh*, que se baseava em parâmetros clínicos (ascite e encefalopatia) e laboratoriais (bilirrubina, albumina e TP/INR) para prever a progressão da doença. O *Score* MELD é usado principalmente para estimar a gravidade relativa da cirrose e o tempo de sobrevida dos doentes; o *score* é calculado apenas em função de 3 parâmetros laboratoriais: $[0,975 \times \log (\text{creatinina sérica } \text{mg/dL})] + [0,378 \times \log (\text{bilirrubina total } \text{mg/dL})] + [1,12 \times \log (\text{INR})] + 0,643$. A forma mais eficaz de travar a progressão da fibrose hepática (cirrose) e o risco de descompensação hepática é tratar eficazmente e em tempo oportuno a infeção pelo VHC (Van der Meer, 2012).

3.4 Coinfeção VHC / VIH

As elevadas taxas de coinfeção pelos dois vírus é explicada pelo facto de partilharem a mesma via de transmissão (contato “sangue-sangue”), apesar do risco relacionado com a via sexual do VHC ser muito inferior ao do VIH (Boesecke, 2011). De acordo com dados da OMS a coinfeção VHC/VIH é relativamente frequente e os dados mais recentes apontam para cerca de 1,2 milhões de pacientes, o que representa cerca de 25% de todos os doentes infetados pelo VIH (Kim, 2013). A prevalência da coinfeção é maior nos países da Europa de Leste e do Médio Oriente (cerca de 70%) e menor nos da Europa Central, no Reino Unido e na Austrália (10 a 15%) (Rockstroh 2011, CDC 2011).

Em mais de 80% dos doentes coinfetados que apresentam anticorpos anti-VHC positivos, o ARN-VHC é detetável e a carga viral aumenta mais rapidamente durante a fase aguda da infeção e atinge valores mais elevados do que nos pacientes monoinfetados pelo VHC; em muitos doentes coinfetados o padrão da carga viral ARN-VHC é intermitente. Os anticorpos anti-VHC mantêm-se positivos até à instalação da fase de imunodeficiência grave (linfócitos T CD4+ <200/mL) induzida pelo VIH; um resultado de anti-VHC persistentemente negativo na fase final da doença não exclui o diagnóstico de infeção concomitante pelo VHC (Opravil, 2008).

Os doentes com coinfeção VHC/VIH têm pior prognóstico do que os monoinfetados pelo VHC; a progressão para a fibrose é mais rápida por diminuição da resposta

quantitativa dos linfócitos T CD4+ à infecção pelo VHC; a incidência de cirrose é de 15 a 25% num período de 10 a 15 anos nos coinfectados em relação aos cerca de 2 a 6% verificados nos doentes não infectados pelo VIH (Soto, 1997); do mesmo modo a incidência de CHC é maior e a esperança de vida ao fim de 10 anos é muito menor (Giordano, 2004).

3.5 Coinfecção VHC / VHB

O VHC e o VHB são os agentes etiológicos mais frequentes de doença hepática crónica em todo o mundo e partilham a mesma via de transmissão (contato “sangue-sangue”). De acordo com a região geográfica a prevalência da coinfecção varia entre 9 e 30%; este número pode estar subestimado em virtude de ser clinicamente muito difícil suspeitar da presença de uma infecção oculta pelo VHB (AgHBs negativo e ADN-VHB detetável no soro ou nos hepatócitos) nos doentes com hepatite crónica pelo VHC. Em virtude dos doentes coinfectados (ARN-VHC e ADN-VHB detetáveis) terem um risco muito elevado de progressão para cirrose, de descompensação hepática e de evolução para CHC são elegíveis para tratamento (Chu, 2008).

Os perfis virológicos que podem ser encontrados nos doentes com coinfecção VHC/VHB são caracteristicamente muito variados:

- A infecção pelo VHC pode inibir a replicação do VHB que, nestes casos, apresentam uma carga viral (ADN-VHB) mais baixa do que seria expectável, uma diminuição da atividade da polimerase ADN-VHB e da expressão quer do AgHBs, quer do AgHBc nos hepatócitos.
- O VHC e o VHB podem inibir a replicação viral um do outro (supressão simultânea) e os doentes apresentarem cargas virais menores do que seria esperado, nomeadamente não detetáveis, ou apresentarem períodos alternados de dominância entre eles com um padrão flutuante; contudo, na coinfecção crónica a dominância do VHB em relação ao VHC é maior nos indivíduos de etnia asiática em relação aos das outras e vice-versa.
- Em qualquer dos casos para além da determinação da carga viral do VHC e do VHB deve ser pesquisada a presença do vírus da hepatite delta (VHD) (Sagnelli, 2002).

A coinfecção VHC/VHB pode estar relacionada com vários cenários clínicos:

- Hepatite aguda por exposição simultânea aos dois vírus: é uma situação rara que se caracteriza pelo atraso no aparecimento do AgHBs, cujas concentrações são menores do que as observadas nas infeções agudas isoladas pelo VHB e por valores menores da atividade da ALAT, que apresenta um padrão de elevação bifásico; esta situação deve-se à supressão parcial ou total da replicação do VHB induzida pelo genoma do VHC; em determinadas situações pode ser responsável por o AgHBs deixar de ser detetado; a dinâmica (cinética) da depuração viral (recuperação espontânea) é semelhante à que ocorre nos doentes monoinfetados por cada um destes vírus (Pimentel, 1999).
- Hepatite C ativa em doentes AgHBs inativos (ARN-VHC detetável associado a AgHBs detetável e ADN-VHB não detetável): quando o VHC é o principal responsável pela doença hepática, deve ser tratado de acordo com as regras que se aplicam aos doentes monoinfetados; com a resolução da infeção pelo VHC há um risco potencial elevado de reativação do VHB que, se for verificado (carga viral ADN-VHB), deve ser tratado de modo adequado.
- Hepatite B ativa em doentes com infeção pelo VHC inativa ou resolvida anteriormente (ADN-VHB detetável associado a ARN-VHC não detetável e anticorpos anti-VHC detetáveis): este perfil é mais raro do que o anterior, e é compatível com supressão do VHC pelo VHB.
- Superinfeção pelo VHC: é frequente nas áreas endémicas do VHB, nomeadamente na Ásia, América do Sul e África Subsaariana; pode verificar-se a supressão da replicação do VHB e o AgHBs deixar de ser detetado; o risco de evolução para cirrose e o aparecimento de CHC é maior; a incidência de insuficiência hepática fulminante é maior (23%) do que nos doentes não superinfectados (3%) (Sagnelli 2002).
- Superinfeção pelo VHB: é uma situação mais rara do que a anterior; pode verificar-se supressão do ARN-VHC; o risco de hepatite fulminante é maior.
- Infeção VHB oculta em doentes infectados pelo VHC: tem sido identificada em cerca de 50% dos doentes com infeção crónica pelo VHC; está associada com valores da atividade da ALAT, lesões necróticas-inflamatórias hepáticas e risco de evolução para cirrose maiores.

4. TERAPÊUTICA

O principal objetivo do tratamento dos doentes com infecção pelo VHC é diminuir todas as causas de mortalidade, sobretudo as que estão relacionadas com as MEH, o número de portadores (contatos infetantes) e as complicações da doença hepática, designadamente a descompensação e o CHC, pela eliminação do vírus (ARN-VHC não detetado por ensaios cujo LoD deve ser ≤ 15 UI/mL).

Durante o tratamento a cinética do declínio do ARN-VHC é um forte preditor da resposta. Medições de ARN-VHC às 4, 12 e 24 semanas são importantes para o tratamento da resposta guiada de PEG-IFN/RBV mas também para a terapia tripla incluindo BOC, TLV, SMV e FDV (Cornberg *et al.*, 2014).

Considera-se que o objetivo foi alcançado quando se atinge uma resposta virológica mantida (SRV) ao longo dos anos, pelo menos, a partir da 12ª semana depois do tratamento ter terminado. Estudos prospetivos mostram que mais de 99% dos pacientes mantêm SRV (marcador de cura da infecção) ao fim de 5 anos de monitorização.

A monitorização da eficácia do tratamento é baseada em repetidas medições dos níveis de ARN-VHC, conforme referido anteriormente, e para tal deve ser utilizado um ensaio, sensível, exato com um intervalo dinâmico, alargado de quantificação. O mesmo ensaio, idealmente do mesmo laboratório, deve ser usado em cada paciente para medir o ARN-VHC em diversos pontos do tempo de forma a tornar consistentes os resultados. Os vários pontos permitem monitorizar a eficácia do tratamento e eventualmente tomar decisões na duração da terapêutica. As medições deverão ser realizadas quando e se os resultados das mesmas tiverem influência no esquema de tratamento, isto é no acesso da adesão dos pacientes à terapia (determinação na 2ª semana), se o resultado determinar que o tratamento deverá ser abandonado (regras de futilidade, devido ao limiar da carga viral ser excedido ou detetado no soro), que o tratamento possa ser abreviado, (terapia guiada pela resposta), ou o tratamento tiver sido bem-sucedido (acesso ao SVR no fim do tratamento e pós-tratamento).

Os doentes com SRV têm ARN-VHC não detetáveis, valores da atividade da ALAT (marcador biológico de lesão hepatocelular) dentro dos intervalos de referência, anticorpos anti-VHC positivos e ausência de sinais histológicos de hepatite ativa [Recommendations for Testing, Managing and Testing Hepatitis C disponível em (<http://www.hcvguidelines.org/node/63>) consulta em 2015-06-06].

Determinar a probabilidade de SRV antes de iniciar o tratamento da infecção pelo VHC é um passo muito importante para que possam ser tomadas as decisões clínicas mais adequadas para cada doente. Na abordagem dos doentes candidatos à terapêutica devem ser considerados e analisados os fatores relacionados com os indivíduos, e virais que condicionam a sua eficácia e o prognóstico dos doentes:

- Fatores do hospedeiro: idade, género, etnia, índice de massa corporal, dados epidemiológicos da população onde vive e das regiões por onde passou, genes e polimorfismos genéticos com impacto no prognóstico da infecção, grau de fibrose (histologia hepática) e esteatose, comportamentos de risco relacionados com a via de transmissão, manifestações extrahepáticas da infecção pelo VHC e outras comorbilidades que, embora não estejam diretamente relacionadas com o VHC, podem agravar o seu prognóstico (exemplo: doença da adição).
- Fatores virais: carga viral, genótipo/subtipo, presença de mutações de resistência, coinfeção (exemplo: VHC/VHB e VHC/VIH) (Matsuura *et al.*, 2014). Outros fatores virais preditores da resposta à terapêutica baseada em interferão incluem as substituições de aminoácidos nas posições 70 e 91 na região do núcleo do VHC e na região de determinação de sensibilidade do IFN na região NS5A nos pacientes infetados com o genótipo 1. A análise dos genes candidatos revelou uma associação entre os vários genes do hospedeiro e os espontâneos ou o tratamento induzido da erradicação do VHC. Isto inclui o IFNAR1, o MAPKAPK3, o KIR2DL3 e o ligando HLA-C1 e tipo HLA (Matsuura *et al.*, 2014).

As evidências têm demonstrado que o tratamento é eficaz e diminui significativamente as taxas de morbilidade e de mortalidade de todos os doentes com infecção crónica. Deste modo deve ser instituído com carácter urgente naqueles que apresentam fibrose avançada com septos ou cirrose hepática compensada, estão a aguardar transplante hepático, têm coinfeções (VHC/VHB e VHC/VIH) ou têm MEH graves [Recommendations for Testing, Managing and Testing Hepatitis C (<http://www.hcvguidelines.org/node/63>) consulta em 2015-06-06].

Contudo, existem situações clínicas em que o tratamento não está indicado ou está contraindicado, designadamente nos doentes cuja esperança de vida por comorbilidades que não estejam diretamente relacionadas com a infecção é inferior a 12 meses, que apresentem descompensação hepática, nas mulheres grávidas e nos doentes com patologias do foro psiquiátrico que não estejam compensadas [Recommendations for

Testing, Managing and Testing Hepatitis C disponível em (<http://www.hcvguidelines.org/node/63>) consulta em 2015-06-06; Velosa *et al.*, 2012].

As taxas de SVR aumentaram de 5-20% com a monoterapia de IFN e posteriormente até 40-50% com a combinação de IFN-ribavirina. O desenvolvimento do interferão peguilado veio melhorar a sua farmacocinética e a sua administração, assim como as taxas de SVR em particular para o genótipo tipo 1. Estão disponíveis no mercado dois tipos de PEG-IFN: PEG-IFN α -2a e PEG-IFN α -2b, cuja eficácia terapêutica é semelhante (taxas de SVR) (McHutchison, 1998; Ascione, 2010).

4.1 Fármacos Antivirais de Ação Direta

4.1.1 Inibidores da protease NS3/4A

Até 2011 o tratamento da infecção era efetuado, numa primeira fase, apenas com o interferão (IFN) cujas taxas de SRV variavam de 5 a 20% e posteriormente com a associação do IFN- α com a ribavirina (PEG-IFN/RBV) cujas taxas passaram para 40-50%; nos últimos anos desta fase terapêutica passou a ser utilizado o interferão peguilado α (PEG-IFN).

A partir de 2011 com a aprovação do telaprevir (TLV) e do boceprevir (BOC) para o tratamento da infecção pelo genótipo 1 do VHC entrámos numa nova era. São fármacos antivirais de ação direta (AADs) de primeira geração com atividade antiprotease (IPs), que inibem a serina protease NS3/NS4A. Contudo, tanto um como outro, só devem ser administrados num esquema de terapêutica tripla, associados ao PEG-IFN/RBV, uma vez que em monoterapia induzem o aparecimento de resistências virais muito rapidamente; por outro lado não devem ser administrados simultaneamente por terem o mesmo mecanismo de ação e por darem resistências cruzadas entre si. A ação acessória mais frequente relacionada com a sua administração é a anemia (Kanda, Nakamoto, Shuang e Yokosuka, 2014).

O BOC, o TLV e o simeprevir (SMP) são metabolizados no fígado pelo citocromo p450-3A4 e p450-3A5 (CYP3A4/5); os fármacos e outras substâncias ativas que induzam ou inibam a sua atividade alteram a farmacocinética e a farmacodinâmica destes AADs que podem ter repercussões importantes na terapêutica; os indutores da sua atividade podem levar a uma diminuição significativa da concentração do BOC, do TLV e do SMP (exemplos: álcool, efavirenz, nefirapina, rifampicina, fenitoína,

fenobarbital, carbamazepina e glucocorticoides), e os inibidores a um aumento da sua concentração, podendo dar origem a sobredosagem (exemplos: amiodarona, macrólidos, delavirdina, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir e antifúngicos azólicos) (RCM Victrelis – Boceprevir, 2011; RCM Incivo – Telaprevir, 2011).

Os esquemas triplos têm-se mostrado muito eficazes (elevadas taxas de SVR) tanto nos doentes infetados que nunca foram submetidos a tratamento, como naqueles que não responderam ou tiveram respostas parciais à terapêutica dupla com PEG-IFN/RBV (EASL, 2013).

4.1.1.1 Boceprevir (BOC)

O Boceprevir é uma molécula de estrutura linear peptidomimética cuja ligação reversível (covalente) ao local ativo da protease NS3 (Ser139) inibe a serina protease NS3/4A e consequentemente a replicação viral nas células infetadas pelo VHC. Está indicado no tratamento dos doentes infetados pelo genótipo 1 que tenham doença hepática compensada (RCM Victrelis – Boceprevir, 2011).

O estudo SPRINT-2 (*Serine Protease Inhibitor Therapy 2* - fase III), envolvendo 1097 pacientes que nunca tinham sido submetidos a tratamento anterior e que estavam infetados pelo genótipo 1, demonstrou que a terapêutica tripla administrada durante 44 semanas PEG-IFN α 2b/RBV + BOC adicionado a partir da 4ª semana melhorou significativamente a SVR dos doentes. A resposta (diminuição da carga viral à 4ª semana; *cutoff* de 100 UI/mL) à administração inicial de PEG-IFN/RBV é muito importante para prever o sucesso terapêutico da associação posterior do BOC. Neste estudo os doentes que tiveram eRVR (*Extended Rapid Virologic Response* - ARN-HCV negativo [LLD (Lower Limit of Detection: <10-15IU/ml) não LLQ (Lower Limit of Quantification) entre a semana 8 e semana 24 de terapêutica com BOC; critério de RGT (*Response Guided Therapy*) para o BOC], foram submetidos a uma terapêutica com duração total de 28 semanas e cerca de 96% conseguiram alcançar SVR.

A eficácia do tratamento triplo com BOC ou com outros AADs é semelhante independentemente do tipo de interferão utilizado - PEG-IFN α -2b ou PEG-IFN α -2a e de se tratar de doentes submetidos a terapêutica pela primeira vez terem recidivas ou tenham tido respostas parciais; a duração do tratamento pode ir de 28 a 48 semanas em função do nível de fibrose hepática e da carga viral monitorizada às 4, 8, 12 e 24 semanas de tratamento (Flamm, 2013; Vermehren *et al.*, 2014).

Na terapêutica tripla com boceprevir a adição deste IP ao tratamento induz uma diminuição adicional dos valores de hemoglobina de cerca de 1g/dl até à 8ª semana, devendo os pacientes ser vigiados com a realização de hemogramas antes e durante o tratamento, (Barritt, 2012) podendo alguns destes doentes apresentar hemólise intravascular grave com anemia sintomática.

Se ocorrer anemia significativa com hemoglobina <10g/dl a dose de ribavirina deve ser reduzida ou se inferior a 8,5g/dl deve ser parado o tratamento (EASL, 2014).

4.1.1.2 Telaprevir (TLV)

O Telaprevir é também uma molécula de estrutura linear peptidomimética que, à semelhança do anterior, inibe reversivelmente a serina protease NS3/4A e consequentemente a replicação viral nas células infetadas pelo VHC. Está indicado no tratamento dos doentes infetados pelo genótipo 1 que tenham doença hepática compensada.

Dois grandes estudos (ADVANCE fase III e ILUMINATE fase III) envolvendo 1628 pacientes infetados pelo genótipo 1, que nunca tinham sido submetidos a tratamento, demonstraram que a terapêutica tripla com PEG/IFN/RBV/TLV aumentaram significativamente a SVR em comparação com a dupla PEG-IFN/RBV. Outros estudos comparativos (ADVANCE e ILUMINATE) demonstraram a maior eficácia da terapêutica tripla com TLV, principalmente quando era administrado durante 12 semanas, em relação à dupla sem este fármaco; a duração total do tratamento (24 *versus* 48 semanas) é condicionada pelos valores da carga viral determinada à 4ª e à 12ª semana. Uma análise retrospectiva dos dados demonstrou que a carga viral (ARN-VHC) à 4ª semana de tratamento com PEG-IFN/RBV/TLV, principalmente se os seus valores forem ≥ 1000 UI/mL, é preditiva da não resposta ao TLV e a terapêutica deve ser interrompida nessa altura.

Uma análise retrospectiva do estudo PROVE 2 revelou que os 12 doentes naïve que tinham o genótipo *IL28BCC* e não apresentavam cirrose alcançaram SVR após 12 semanas de tratamento triplo com PEG-IFN/RBV/TLV. Em contrapartida no ensaio prospetivo CONCISE no qual foram avaliados 239 doentes, uns submetidos a 12 semanas de tratamento com PEG-IFN/RBV/TLV e outros durante 24 semanas, demonstrou que os primeiros com RVR tiveram taxas de SVR de 87% enquanto os segundos apresentaram taxas de 97% (Nelson *et al.*, 2013).

A FDA e a EMA aprovaram RGT para os pacientes *naïve* sem cirrose hepática, mas a duração do tratamento aceite para BOC RGT é diferente da definição do estudo Phase III (BOC 32 *versus* 24 semanas para pacientes sem eRVR [ARN-HCV negativo (LLD não LLQ)] entre a semana 4 e semana 12 da terapêutica com TLV; critério de RGT para TLV. Adicionalmente, regras de futilidade na informação da prescrição diferem das aplicadas nos ensaios da Phase III.

Deste modo não há semana 12 de critério de paragem no estudo SPRINT-2, enquanto que pacientes que supostamente descontinuariam o tratamento se tivessem ARN-VHC à semana 12 no ensaio RESPOND-2. Nenhum dos 65 pacientes com ARN-VHC com nível >100IU/ml à semana 12 alcançou SVR no estudo SPRINT-2. No entanto 21 pacientes alcançaram SVR apesar de detetável ARN-VHC mas <100IU/ml à semana 12. Baseado na análise retrospectiva num pequeno número de pacientes, tal suporta as regras de futilidade > 100IU/ml à semana 12. Não há regra de paragem na semana 8 na informação de prescrição para BOC, quando se compara o critério de paragem estabelecido para TLV (4 semanas de terapia tripla). No entanto, os dados da Phase III fornecem algum suporte para a regra de paragem à semana 8.

Os dois inibidores da protease NS3/4 BOC e TLV poderão conduzir a anemia hemolítica, a qual é já uma consequência do tratamento com ribavirina, mas a adição de um IP parece fazer com que esta se torne mais frequente e por vezes mais agressiva (Jacobson *et al.*, 2012).

Em Portugal o medicamento ainda não está disponível, uma vez que o processo de comparticipação se encontra em curso.

4.1.1.3 Faldaprevir (FDV)

O Faldaprevir é um inibidor reversível da serina protease NS3/4A e consequentemente a replicação viral nas células infetadas pelo VHC. O FDV foi estudado em ensaios clínicos (START verso - fase III) em doentes infetados pelo genótipo 1 que nunca tinham sido submetidos a tratamento, que fizeram tratamento mas que não responderam ou tiveram respostas parciais, e em coinfetados VHC/VIH. No estudo START verso os pacientes do grupo 1 fizeram 18 semanas de PEG-IFN/RBV e os do grupo 2 fizeram 24 semanas PEG-IFN/RBV em combinação com 120 mg de FDV por 12 e 24 semanas.

De uma forma geral, a terapia tripla com FDV resulta em 72-73% de SVR que foi 22-23% mais alta *versus* a dupla PEG-IFN/RBV. 84% dos pacientes tratados com FDV

alcançaram ETS [(*Early Treatment Success* - ARN-VHC < 25 UI/mL na 4ª semana e não detetável na 8ª; critério para o FDV)] e puderam ser tratados por um período pequeno de 24 semanas com 83% de SVR. Pacientes com subtipo 1a apresentaram taxas ligeiramente superiores de progresso (10% *versus* 4%) e recidiva (10-16% *versus* 6-8%) comparados com os pacientes infectados pelo subtipo 1b (Jensen *et al.*, 2013).

4.1.1.4 Simeprevir (SMP)

O Simeprevir (SMP) foi aprovado pela FDA em Dezembro de 2013. É uma molécula com estrutura macrocíclica que inibe a serina protease NS3/4A e consequentemente a replicação viral nas células infectadas pelo VHC (Kanda, 2014).

A sua eficácia *in vitro* conjugada com as propriedades farmacocinéticas, sugere boas perspectivas para a terapêutica da infeção por todos os genótipos do VHC (Lin *et al.*, 2008), embora a sua ação não seja muito eficaz para o 3 (Moreno *et al.*, 2012). Para além de ser um fármaco com elevada especificidade para a NS3/NS4A das estirpes dos subtipos 1a e 1b, tem efeitos sinérgicos quer com o interferão- α , quer com o inibidor da NS5B (ARN polimerase ARN dependente) e aditivos com a ribavirina (RBV).

Foram identificadas em estudos efetuados *in vitro* e *in vivo* diversas mutações de resistência viral ao simeprevir, nomeadamente: V36M, Q41R, F43S, T54S, Q80K/R/L, R155K, A156T/V e D168N/A/V/E/H/T; a mutação R155K isolada ou associada a outras nas posições 80 e/ou 168 ao nível da NS3 são mais frequentes nas estirpes do subtipo 1a e as D168E e D168V nas do subtipo 1b. Para evitar a emergência de estirpes (variantes) virais resistentes, o SMP deve ser administrado em associação com outros fármacos antivirais.

Foram observadas taxas mais elevadas de SVR nos doentes infectados com subtipo 1a que foram tratados com simeprevir e eram portadores do polimorfismo Q80K em relação aos que não eram.

Parece existir benefício na terapêutica com SMP nos doentes que não responderam a outras terapêuticas e nos que têm estadios avançados de fibrose ou cirrose. Olhando para o genótipo *IL28B* rs12979860, no estudo de Kanda 2014, as taxas de SVR com 150 mg foram de 88% para CC, 74% para CT, e 61% para o TT (*versus* 18%, 31% e 14% respetivamente no grupo controlo).

Nos doentes que já tinham sido submetidos a terapêutica anterior o tratamento durante 12, 24 ou 48 semanas com simeprevir (100mg QD ou 150 mg QD) em combinação com

48 semanas de peginterferão associado à ribavirina aumentaram significativamente as taxas SVR. Nos doentes tratados com simeprevir com resposta virológica rápida (ARN-VHC < 25 UI/mL ou indetetável na 4ª semana), 89,6% alcançaram SVR12. Taxas SVR12 de 94,7%, 92,3%, 85,4% e 83,9% foram alcançadas em doentes tratados com simeprevir com genótipo CC, linha de base de ARN-VHC <800000 UI/mL, subtipo 1b e grau de fibrose METAVIR F0-F2 (de ausente até moderada), respetivamente. Num estudo de Kanda, 2014 o simeprevir associado ao interferão e à ribavirina levou a 57% de SVR em pacientes com genótipo 1 que não responderam à terapêutica e estão coinfectados com VIH. A taxa total de SVR12 foi de aproximadamente 74%.

O Simeprevir mostrou-se eficaz no tratamento de doentes que tiveram uma recaída com interferão, incluindo os que apresentam um genótipo minor *IL28B* e um *score* F4 METAVIR (Kanda, 2014). A eficácia do Simeprevir em combinação com 2 inibidores da polimerase NS5B Tib-NI e Tib-NII mostrou ser mais eficaz na diminuição dos níveis de replicação viral e na erradicação do VHC (Lenz *et al.*, 2012).

O simeprevir para além de aumentar a exposição ao tenofovir, apresenta resistência cruzada com este fármaco nas posições 155 e 156 dos aminoácidos; a maioria das mutações de resistência ao telaprevir estão reportadas para a posição 168; são necessários estudos adicionais para determinar se o simeprevir é eficaz contra as variantes seleccionadas positivamente com o tratamento antiretroviral (Matsuura *et al.*, 2014).

Num futuro próximo, a utilização do simeprevir pode permitir a administração de esquemas terapêuticos sem IFN melhorando significativamente a qualidade de vida dos doentes (Kanda *et al.*, 2014).

As últimas *guidelines* da EASL 2014 indicam que as regras de futilidade foram definidas apenas para a combinação tripla de PEG-IFN α , ribavirina e simeprevir. Com esta combinação o tratamento deve ser parado se o nível de ARN-VHC é ≥ 25 IU/ml na semana 4, 12 ou 24.

Os pacientes que recebem simeprevir podem sofrer de *rash* e fotosensibilidade, e hiperbilirrubinemia indireta (EASL, 2014).

4.1.1.5 Asunaprevir

O Asunaprevir (BMS-650032) é um inibidor da protease NS3 que apresenta, *in vitro*, uma boa eficácia terapêutica para os genótipos 1, 4, 5 e 6, e uma atividade antiviral

menor para os genótipos 2 e 3. No âmbito terapêutico quando é associado a outros fármacos antivirais tem um efeito sinérgico ou aditivo (exemplo: a sua combinação com o IFN e o daclatasvir, que é um inibidor da NS5A, está associada a taxas de SVR mantidas elevadas). Num estudo de Gentile *et al.*, 2014, em que foram avaliados os resultados do asunaprevir em esquemas terapêuticos livres de interferão, os autores concluíram que nos doentes infetados pelo genótipo 1 e que não responderam a terapêuticas administradas anteriormente, a sua associação ao daclatasvir foi eficaz para a maioria dos doentes com subtipo 1b; a sua ação no subtipo 1a não foi eficaz. O asunaprevir apresenta também um efeito sinérgico/aditivo com a ribavirina e o interferão-lambda recombinante (Gentile *et al.*, 2014).

Num estudo *in vitro* foram identificadas as mutações R155k, D168G e I170T como as primeiras relacionadas com a NS3 do subtipo 1a induzidas pelo asunaprevir; entretanto têm sido identificadas outras para a mesma região, designadamente as mutações duplas Q80K com D168V e Q80K (mais frequente) com D168E e as D168G/V/H/Y.

As estirpes resistentes de asunaprevir não exibem resistência cruzada com os inibidores da NS5A (Gentile *et al.*, 2014).

O asunaprevir, tal como o simeprevir, pode permitir a administração de esquemas terapêuticos sem IFN melhorando significativamente a qualidade de vida dos doentes (Gentile *et al.*, 2014).

4.1.2 Outros inibidores da protease NS3/NS4A

Existem outros inibidores da protease NS3/4A que ainda não foram comercializados por se encontrarem em vários estadios de desenvolvimento ou fases de ensaios, nomeadamente o danoprevir (R7227), o narlaprevir, o vaniprevir e os ACH-1625, IDX320, ABT-450, MK-5172, GS-9256 e GS-9451; vão alargar significativamente as opções de tratamento para a infeção crónica pelo VHC num futuro próximo, aumentar a eficácia, a segurança e a tolerância, assim como o espectro de ação para outros genótipos que não apenas o 1 e possibilitar terapêuticas com dose única diária (Ferenci, *et al.* 2013). Num estudo de Gentile *et al.*, 2014, onde é avaliado o MK-5172 são já descritos resultados de taxas de erradicação do VHC quando combinado com interferão peguilado e ribavirina em cerca de 90% dos casos, e com melhores resultados que a terapêutica tripla com boceprevir. A associação deste fármaco com outros em esquemas terapêuticos livres de interferão está relacionada com taxas de erradicação muito

elevadas (89-100%), demonstrando maior atividade contra as variantes associadas à resistência do que os inibidores de protease de primeira geração.

Os alvos dos fármacos antivirais de ação direta no VHC são observáveis na figura 5.

4.1.3 Inibidores da polimerase NS5B

Os inibidores da NS5B (polimerase ARN dependente) podem ser divididos em dois grandes grupos: os inibidores análogos dos nucleósidos e os inibidores não análogos dos nucleósidos. Os inibidores análogos dos nucleósidos (NIs) como o mericitabine, o sofosbuvir e o ALS-220, mimetizam os substratos naturais da polimerase, vão sendo incorporados na cadeia de crescimento do ARN e bloqueiam o sítio ativo da NS5B terminando a cadeia; como o centro ativo da NS5B é uma região altamente conservada do genoma do VHC, os NIs são eficazes (potencialmente) contra todos os genótipos; substituições simples de aminoácidos no centro ativo da NS5B tanto podem levar à perda de função como a situações de extrema replicação. Pelas características referidas o desenvolvimento de resistências para este tipo de fármacos (NIs) é muito mais difícil do que em relação aos que foram descritos anteriormente (Cornberg *et al.*, 2014).

4.1.3.1 Inibidores análogos dos nucleósidos

4.1.3.1.1 Sofosbuvir (SOF)

O Sofosbuvir (SOF) é um análogo dos nucleósidos que inibe a polimerase ARN-dependente (NS5B); foi aprovado nos EUA, pela FDA, em Dezembro de 2013 e na União Europeia, pela EMA, em Janeiro de 2014. Tem uma atividade antiviral pangenotípica e uma elevada barreira genética à resistência. A terapêutica livre de interferão com sofosbuvir alcançou taxas elevadas de resposta sustentada tanto em pacientes *naïve*, como em doentes que foram submetidos a outros tipos de tratamento para infeções pelo genótipo 1, 2 ou 3.

O sofosbuvir associado à ribavirina é também eficaz nos doentes coinfectados VHC/VIH; quando a associação é administrada antes do transplante hepático previne as infeções recorrentes pelo VHC na maioria dos doentes que têm níveis de ARN-VHC inferiores ao limite de deteção do método. O estudo NEUTRINO avaliou o uso de PEG-IFN/RBV e SOF em 327 pacientes *naïve* com infeção pelos genótipos 1, 4, 5 e 6. A

terapêutica foi dada durante 12 semanas. O total de SVR para todos os doentes (292) com infecções pelo genótipo 1 foi de 89%. Os doentes cirróticos alcançaram taxas de SVR de 80% (Lawitz *et al*, 2013).

O SOF foi também avaliado num esquema terapêutico sem interferão, associado à RBV em doentes monoinfetados e coinfectados com VIH no ensaio PHOTON. Foi selecionada uma população de pacientes com fatores de prognóstico negativo em relação ao sucesso terapêutico. Muitos doentes eram homens afro-americanos que estavam infectados pelo subtipo 1a e tinham um genótipo *IL28BCT/TT*. Na primeira parte do estudo 10 pacientes com fibrose ligeira a moderada (F0-F2) de acordo com a escala METAVIR foram tratados com RBV e SOF durante 24 semanas: 90% atingiram SVR. Na segunda parte do estudo 50 pacientes foram igualmente distribuídos de forma aleatória sendo administradas diferentes doses de RBV associada a SOF durante 24 semanas. No grupo de baixa dose de RBV 48% atingiram SVR enquanto no grupo de RBV baseado no peso a taxa de SVR foi de 68% (Cornberg *et al.*, 2014).

Os esquemas terapêuticos que utilizam o sofosbuvir e não têm interferão são bastante promissores e encontram-se em desenvolvimento. Até ao momento, só foram identificadas resistências ao sofosbuvir nos esquemas de monoterapia (mutação S282T) (Svarovskaia *et al.*, 2012).

O sofosbuvir é eliminado predominantemente pelos rins, estando a sua administração contraindicada nos doentes com valores da taxa de filtração glomerular inferior a 30 mL/min/1,73m², pelo risco de toxicidade por exposição a concentrações elevadas dos seus metabolitos. Todos os fármacos e substâncias ativas indutoras da glicoproteína P (P-gp: diretamente envolvida nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de diferentes fármacos) são responsáveis pela diminuição significativa das concentrações séricas de sofosbuvir e podem levar à redução do efeito terapêutico (exemplos: rifampicina, carbamazepina, fenitoína e erva de São João - hipericão) [RCM Sovaldi - Sofosbuvir, 2013].

A combinação tripla de IFN- α peguilado, ribavirina e sofosbuvir parece ser a opção mais eficaz e mais simples nos doentes infectados pelo genótipo tipo 1, que não tenham sido submetidos a tratamentos anteriores, embora encerre o risco de selecionar resistências no caso de falha do tratamento. A associação do sofosbuvir com o simeprevir, com ou sem ribavirina, para os doentes infectados pelo genótipo tipo 1, que não tenham sido submetidos a tratamentos anteriores, aparece como a mais atraente das combinações em Abril de 2014. A combinação do sofosbuvir com a ribavirina é

subótima nos doentes infetados pelo genótipo 1 e deverá ser reservada para casos em que nenhuma outra opção está disponível ou nos que estejam infetados pelo genótipo 2. Para o genótipo 3, a combinação tripla IFN- α peguilado, ribavirina e sofosbuvir aparece como sendo mais eficaz do que a combinação do sofosbuvir com a ribavirina que não é eficaz nos doentes com cirrose que falharam previamente o esquema IFN e ribavirina. Nas situações em que estas opções não estão disponíveis a combinação de IFN α – peguilado e ribavirina é considerada aceitável (EASL, 2014).

Tal como o simeprevir e daclatasvir, o sofosbuvir também é bem tolerado, mas a função renal deve ser regularmente avaliada nos pacientes sujeitos a este fármaco (EASL, 2014).

4.1.3.2 Inibidores não análogos dos nucleósidos

Estão identificados 4 locais de ligação alostéricos onde os inibidores não análogos dos nucleósidos podem exercer a sua ação farmacológica de inibição da polimerase NS5B. Atualmente numerosos fármacos deste grupo estão em diferentes fases de avaliação clínica (I e II), nomeadamente os inibidores “dedo polegar” 1 - BI207127, BMS-791325, “dedo polegar” 2 - filibuvir e VX-222; “palma da mão” I - ANA 598 e ABT-333 e os “palma da mão” II - tegobuvir e IDX-375.

De um modo geral, os inibidores não análogos dos nucleósidos apresentam baixa atividade antiviral e reduzida barreira genética à resistência quando são administrados isoladamente (monoterapia). Devido a estas características estes fármacos só devem ser administrados em associação com outros antivirais. Contrariamente aos análogos dos nucleósidos não desenvolvem atividade antiviral idêntica contra todos os genótipos de VHC (Gentile *et al.*, 2014).

4.1.3.2.1 Filibuvir (FVL)

Os resultados do estudo de Rodriguez-Torres, 2014 demonstraram que a adição de FLV a PEG-IFN/RBV produziram taxas de resposta virológica superiores comparadas com administração de PEG-IFN/RBV apenas.

A RBV desempenha um papel crítico na diminuição do número de recidivas em doentes tratados com PEG-IFN/RBV; no entanto uma análise cuidada dos dados da sua farmacocinética sugerem que não há interações negativas entre a RBV e o FLV. A

rápida emergência de estirpes virais com suscetibilidade reduzida a FLV pode ser responsável pela baixa correlação entre as taxas de SVR e de RVR. Estudos anteriores já tinham evidenciado o aparecimento de mutações (*single-step*) induzidas pelo FLV; no entanto desconhece-se a sua influência no aparecimento de mutações quando é administrado em associação com PEG-IFN e RBV.

A taxa de recidiva (35,9-42,9%) observada num dos “braços” de FLV deste estudo é superior à observada com a terapêutica PEG/IFN-RBV ou com outros esquemas, nos quais a primeira geração de agentes antivirais de ação direta é combinada com PEG-IFN/RBV. A alta taxa de recidiva observada na terapêutica com FLV pode estar relacionada com a potência do agente, a barreira genética à resistência, o mecanismo de ação ou a combinação destas características.

Independentemente da dose administrada de FLV na associação com PEG-IFN/RBV não se verificou uma diminuição significativa das taxas de SVR. É possível que este e outros agentes possam desempenhar um papel importante em futuros esquemas terapêuticos, nomeadamente nos que não incorporam IFN.

4.1.3.2.2 Tegobuvir

O Tegobuvir foi testado em combinação com o IP GS-9256 associado ao peginterferão- α e à ribavirina num esquema terapêutico quádruplo. Com esta combinação obtiveram-se taxas de RVM4 de cerca de 98% em doentes *naïve* infetados pelo genótipo 1 (Nelson *et al.*, 2012). No entanto a empresa farmacêutica anunciou a descontinuação de tegobuvir em Fevereiro de 2014 (Wyles *et al.*, 2014).

4.1.3.2.3 Dasabuvir

O Dasabuvir é também um inibidor não análogo dos nucleósidos da NS5B. A sua utilização associada a outros AADs tem permitido obter taxas de SVR elevadas (cerca de 95%) em doentes infetados pelo genótipo 1 com boa tolerância e segurança (Gentile *et al.*, 2014).

O chamado esquema de tratamento “3D”, que foi aprovado pela FDA em Dezembro de 2014, é uma combinação de quatro fármacos, designadamente de ABT-450, ritonavir, ombitasvir e dasabuvir que pode ser administrado com ribavirina.

Os estudos clínicos PEARL-IV, SAPPHIRE-I e SAPPHIRE-II, incluíram 1060 infetados com o genótipo 1, pacientes nunca antes tratados ou resistentes a outros tratamentos, com ou sem cirrose, que receberam tratamento “3D” combinado, ou não, com ribavirina. Os doentes sem cirrose receberam tratamento de 12 semanas e os pacientes com cirrose 24 semanas. Nos doentes sem cirrose a cura foi semelhante entre os pacientes nunca antes tratados ou naqueles que fracassaram um tratamento anterior utilizando interferão; a taxa de SVR foi de 95,7% nos que combinaram o “3D” com ribavirina, e de 90,2% naqueles que receberam o “3D” sem ribavirina. No grupo de pacientes com cirrose que receberam 24 semanas de tratamento combinado com ribavirina a cura atingiu 90,6%.

Nos estudos SAPPHIRE-II ou PEARL-II foram incluídos 209 doentes infetados pelo genótipo 1 sem cirrose e que não responderam a tratamentos anteriores (ARN-VHC detetável à 24^a semana de tratamento com interferão); foram tratados com o esquema “3D” combinado ou não com ribavirina, tendo-se obtido uma taxa de cura total de 95,7%.

No estudo TURQUOISE-II foram incluídos 380 doentes com cirrose infetados pelo genótipo 1; foram tratados com o esquema “3D” combinado com ribavirina, durante 12 ou 24 semanas; a cura foi conseguida em 91,8% dos que receberam tratamento de 12 semanas e em 95,8% dos que foram tratados durante 24 semanas.

Um outro estudo, CORAL-I, incluiu doentes anteriormente sujeitos a transplante hepático nos quais existiu recidiva e infetados com o genótipo 1 que após o transplante ainda não tinham recebido qualquer tratamento antiviral. Foram tratados com o esquema “3D” e 97% obtiveram a cura da infeção ao fim de 12 semanas de tratamento. Nos pacientes que tomavam ciclosporina e tacrolimus para evitar a rejeição do novo fígado foi necessário adaptar a dosagem devido às interações medicamentosas.

4.1.4 Inibidores da polimerase NS5A

4.1.4.1 Ledispavir

O Ledispavir é um novo fármaco sintético utilizado no tratamento da infeção por VHC. É eficaz nos doentes infetados pelo genótipo 1, mas não está comprovada para os genótipos 4, 5 e 6, nem nos doentes coinfectados, hemodializados, idosos ou que apresentem cirrose descompensada (Gentile *et al.*, 2014).

No tratamento utilizando a sua associação com o sofosbuvir obtiveram-se respostas virológicas sustentadas em doentes infetados pelo genótipo 1 que não tinham tido SVR com esquemas que incorporaram interferão. Num estudo de Afdhal *et al.*, 2014, envolvendo 440 doentes, dos quais 20% apresentavam cirrose e 79% infeções pelo subtipo 1a, foram divididos aleatoriamente de forma a receberem o inibidor NS5A, ledispavir e sofosbuvir (autorizado pela FDA em Outubro de 2014 com o nome de HARVONI) numa dose diária única durante 12 semanas, ledispavir-sofosbuvir durante 24 semanas ou ledispavir-sofosbuvir com ribavirina durante 24 semanas. O *endpoint* primário apresentou uma resposta virológica sustentada às 12 semanas depois do tratamento ter terminado (Thompson, Richard e Lee, 2014).

4.1.4.2 Daclatasvir

O Daclatasvir é o primeiro inibidor altamente seletivo do NS5A (complexo de replicação) que tem um duplo mecanismo de ação, inibindo duas etapas do ciclo de replicação: síntese de ARN e formação e secreção da partícula viral. Foi aprovado em Setembro de 2014 e é eficaz contra os genótipos 1, 2, 3 e 4 (Gentile *et al.*, 2014). Tem uma ação sinérgica com outros AADs. Num estudo de Sulkowski *et al.*, 2014, em que este fármaco foi adicionado ao sofosbuvir para o tratamento quer de doentes que nunca tinham sido submetidos a tratamento, quer dos que já tinham sido mas não tiveram SVR, foi identificada a presença do polimorfismo NS5A-A30K que está associado à resistência natural das estirpes ao daclatasvir. Neste estudo a maioria dos doentes tem uma resposta virológica sustentada, com taxas de 98% nos infetados pelo genótipo 1, independentemente do subtipo viral ou de ter havido ou não falha no primeiro tratamento com inibidores da protease, e de 91% nos doentes infetados pelos genótipos 2 ou 3. Este estudo demonstra igualmente que a combinação de um inibidor da NS5A com um inibidor da NS5B está associado a taxas de cura elevadas mesmo nos doentes que apresentavam estirpes com mutações de resistência para os inibidores da protease que emergiram depois do tratamento sem sucesso com telaprevir ou boceprevir. A associação do daclatasvir com o sofosbuvir apresenta taxas de resposta virológica sustentada elevadas nos doentes com as características enunciadas e que não tinham respondido aos tratamentos – genótipo 3, subtipo 1a, genótipos *IL28B* não-CC e raça negra. Evidências recentes sugerem que o genótipo 3 pode ser mais resistente ao tratamento do que os outros genótipos. Neste estudo 16 dos 18 doentes que estavam

infetados pelo genótipo 3 apresentaram uma resposta virológica sustentada 12 semanas depois de terminado o tratamento e verificou-se que muitos doentes apresentavam genótipos *IL28B* não-CC e a taxa de resposta era maior entre eles (Sulkowski *et al.*, 2014).

Com a combinação tripla de PEG-IFN α , ribavirina e daclatasvir, os pacientes que não alcançam um nível de ARN-VHC < 25IU/mL na semana 4 e indetetável à semana 10 devem receber os 3 fármacos 24 semanas. Os pacientes que não alcançam um nível de ARN-VHC < 25IU/mL na semana 4 e indetetável na semana 10 devem parar o daclatasvir na semana 12 e continuar com PEG-IFN α e ribavirina isolados até à semana 24 (EASL, 2014).

Apesar de existirem poucos dados disponíveis a combinação do sofosbuvir com o daclatasvir, associada ou não à ribavirina é a opção livre de interferão mais atrativa para os doentes infetados pelo genótipo 3 (EASL, 2014).

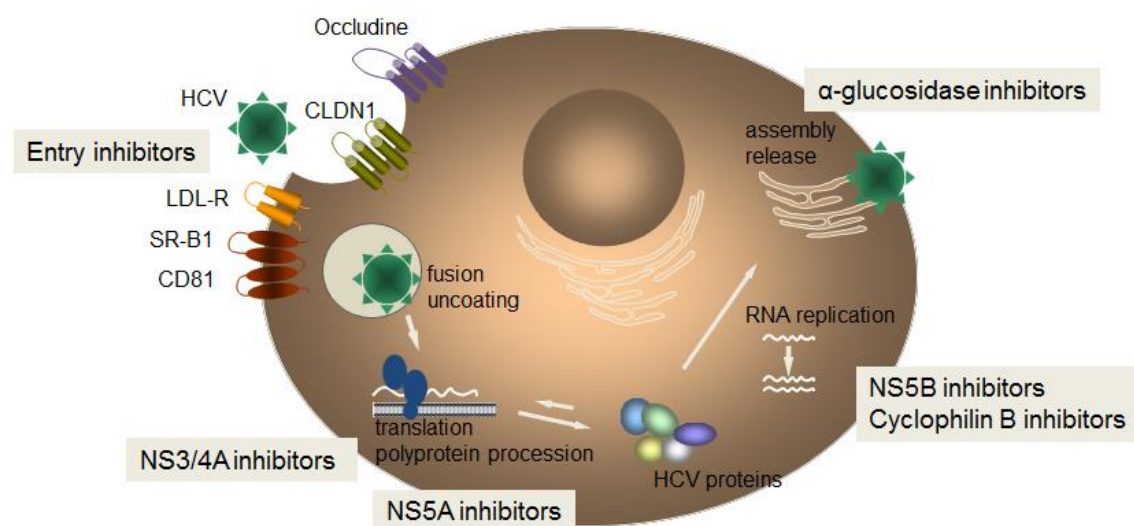


Figura 5 – Representação esquemática do ciclo de vida do VHC e dos alvos dos fármacos antivirais de ação direta (adaptado de Hepatology, 2014)

4.2. Esquemas terapêuticos e sua monitorização laboratorial

Em suma, atualmente são considerados os melhores esquemas terapêuticos atuais desde que disponíveis todos os fármacos: para o genótipo 1b a combinação de “3D” durante 12 semanas ou sofosbuvir com ledispavir durante 8 a 12 semanas; para o genótipo 1a, a combinação “3D” com ribavirina por um período de 12 semanas ou sofosbuvir com ledispavir com 8 a 12 semanas ou peginterferão com ribavirina e sofosbuvir durante 12 semanas; para o genótipo 2 sofosbuvir com ribavirina 12 semanas e para o genótipo 3

em doentes não cirróticos peginterferão com ribavirina e sofosbuvir durante 12 semanas ou sofosbuvir e ribavirina durante 24 semanas. As recomendações internacionais aconselham ainda como as combinações terapêuticas mais eficazes sempre que passíveis de comercialização e devidamente regulamentados para além destes esquemas: para o genótipo tipo 1 peginterferão com ribavirina e sofosbuvir durante 12 semanas, ou peginterferão com ribavirina e simeprevir durante 24 semanas, peginterferão com ribavirina e daclatasvir durante 24 semanas ou sofosbuvir com ribavirina durante 24 semanas ou sofosbuvir com simeprevir durante 12 semanas ou sofosbuvir com daclatasvir durante 12 semanas; para o genótipo 2 também peginterferão com ribavirina e sofosbuvir durante 12 semanas, e para o genótipo 3 sofosbuvir com daclatasvir durante 12 semanas (ver figura 6 e 7).

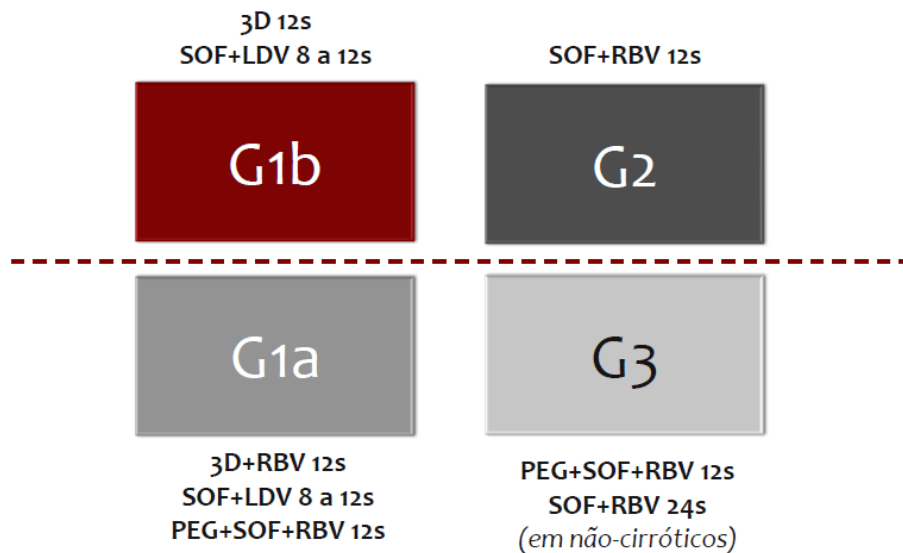


Figura 6 – Resumo das melhores combinações terapêuticas disponíveis atualmente (adaptado de VII Workshop Internacional de Actualização em Hepatologia, 2014).

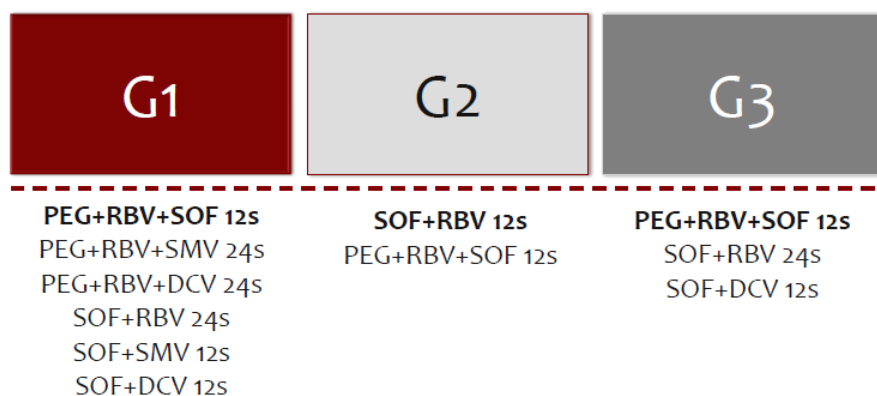


Figura 7 – Recomendações Europeias para o tratamento da hepatite C em 2014
(adaptado de VII Workshop Internacional de Atualização em Hepatologia, 2014)

Conforme referido anteriormente deverá ser efetuada uma monitorização da eficácia do tratamento pelo que nos pacientes tratados com a combinação tripla de PEG-IFN- α , ribavirina e sofosbuvir durante 12 semanas, o ARN-VHC deve ser medido na linha de base e às semanas 4, 12 (final do tratamento), e 12 ou 24 semanas após o final da terapêutica; nos pacientes tratados com a combinação tripla do PEG-IFN- α , ribavirina e simeprevir (12 semanas mais 12 ou 36 semanas de PEG-IFN- α e ribavirina apenas, o ARN-VHC deve ser medido na linha de base, semana 4, 12 e 24 (final do tratamento no tratamento *naïve*, nos recidivantes precedentes), semana 48 (final do tratamento nos precedentes parciais e respondedores nulos), e 12 ou 24 semanas após o final da terapia; nos pacientes tratados com um esquema livre de interferão (sofosbuvir mais simeprevir com ou sem ribavirina 12 semanas, sofosbuvir mais daclatasvir com ou sem ribavirina 12 ou 24 semanas, sofosbuvir com ribavirina 12 ou 24 semanas), o ARN-VHC deve ser medido na linha de base, semana 2 (acesso à adesão), semana 4, semana 12 ou 24 (final do tratamento) e 12 ou 24 semanas após o final da terapêutica (EASL, 2014).

No caso dos pacientes cirróticos que definitivamente alcançam uma SVR devem ser retestados para o ARN-VHC às 48 semanas após o tratamento. Se o ARN-VHC permanece sem ser detetado, a infeção pode ser considerada como erradicada e o ARN-VHC não é necessário ser retestado (EASL, 2014).

5. FATORES GENÉTICOS DE PROGNÓSTICO

5.1 Polimorfismo do nucleótido simples próximo do gene *IL28B*

Em 2009 vários estudos relacionados com a infecção de VHC e associados ao genoma (GWAS – *Genome Wide Association Studies*), incluindo o estudo de Matsuura, 2014, demonstraram que o polimorfismo do nucleótido simples (SNP) próximo do gene da interleucina 28B está fortemente associado com a resposta da terapêutica PEG-IFN/RBV para a infecção do genótipo 1. Como resultado, a predição do tratamento em curso especialmente nos não respondedores a PEG-IFN/RBV, foi significativamente melhorado por genotipagem para o *IL28BSNP*, levando à personalização da medicina para o CHC.

Fabris *et al.*, em Matsuura, 2014 demonstraram que pacientes com genótipo não favorável de *IL28B* estavam em risco aumentado de fibrose hepática severa. Contrariamente um genótipo favorável de *IL28B* demonstrou ser associado a uma elevada atividade inflamatória e progressão de fibrose em vários trabalhos. A inflamação foi mais ativa e a progressão fibrótica foi mais severa em pacientes com um genótipo favorável *IL28B*. Barreiro *et al.*, analisaram o impacto do genótipo de *IL28B* no risco de desenvolvimento de cirrose em pacientes coinfectados com HCV/HIV recebendo terapia antiretroviral. Em pacientes com um genótipo favorável *IL28B*, a cirrose é mais frequente e significa que a alanina aminotransferase está mais elevada que em pacientes com genótipos *IL28B* desfavoráveis, sugerindo que os “portadores” de *IL28B* favoráveis podem demonstrar uma progressão mais rápida de fibrose hepática relacionada com VHC como resultado do aumento da inflamação hepática.

A informação do teste do polimorfismo *IL28B* de nucleótido simples e as substituições da proteína do núcleo podem levar a uma melhor predição da linha de base de SVR nas terapêuticas de simeprevir com peginterferão e ribavirina (Matsuura, *et al.*, 2014).

Dos trabalhos já referidos desenvolvidos em 2009, quatro grupos revelaram uma forte associação entre o polimorfismo genético próximo do locus *IL28B* no cromossoma 19 e a erradicação do VHC por tratamento induzido.

O genótipo CC em rs12979860 demonstrou uma taxa duas vezes superior de atingimento de SVR nos Europeus e Hispânicos, e uma taxa três vezes superior de SVR nos afro-americanos relativamente ao genótipo não-CC. Suppiah *et al.*, analisaram num

outro estudo, Caucasianos, demonstrando que rs8099917 foi o polimorfismo mais fortemente associado a SVR.

Num ensaio liderado por Rauch *et al.*, onde foram investigados 465 Caucasianos infectados com VHC genótipos 1, 2, 3 ou 4, o forte valor preditivo do polimorfismo *IL28B* foi observado nos pacientes com genótipo 1 e 4, mas não nos doentes com infecção 2 e 3. Os estudos precoces documentaram que rs12979860 ou rs8099917 são os polimorfismos mais significativamente associados com a resposta à terapêutica (Matsuura *et al.*, 2014).

Também na coinfeção crónica VHB/VHC/VHB foi identificado o genótipo *IL28BCC* como um preditor independente da erradicação de VHC (Coppola *et al.*, 2014).

Tabela 5 – GWAS de associações entre o genótipo favorável *IL28B* e SVR na terapêutica de PEG-IFN/RBV

Study	Ref.	Population	GWAS/replication size	Significant SNP	Odds ratio	P value	HCV genotype
Ge <i>et al.</i>	⁷	European American, African American, Hispanic	1137/none	rs12979860	3.10	1.37×10^{-28}	1
Suppiah <i>et al.</i>	⁸	Australian, European	293/555	rs8099917	1.98	7.06×10^{-8}	1
Tanaka <i>et al.</i>	⁶	Japanese	142/172	rs8099917	12.10	1.18×10^{-18}	1
Rauch <i>et al.</i>	²⁷	European	465/none	rs8099917	5.19	3.11×10^{-8}	1–4

Favorable *IL28B* genotype means rs8099917 TT or rs12979860 CC genotype.

GWAS, genome-wide association study; *IL28B*, interleukin-28B; PEG-IFN, pegylated interferon; RBV, ribavirin; Ref., reference number; SNP, single nucleotide polymorphism; SVR, sustained virological response.

5.2 Determinação do polimorfismo do gene *IL28B*

O polimorfismo do promotor de *IL28B* na posição -3176 C/T (rs12979860) tem sido recentemente correlacionado com uma taxa de cura espontânea significativamente elevada no vírus da hepatite C, em particular pacientes com o genótipo CC que apresentam uma SVR de 55-80% comparativamente com indivíduos com o genótipo CT ou TT (Thomas *et al.*, 2009).

O genótipo deste alvo num extrato de ácido nucleico é determinado de forma simples através da metodologia de PCR.

Um fragmento longo de 139 pb é amplificado com *primers* específicos e analisado posteriormente numa curva de *melting*, usando um oligómero *SimpleProbe* que é específico para o alelo C-3176. Os fragmentos de PCR resultantes são analisados com uma sonda *SimpleProbe* e os genótipos são identificados fazendo correr uma curva de

melting com pontos de *melting* específicos T_m . O alelo T tipo selvagem exibe uma T_m de 51,4°C (capilar) ou 55°C (placa), enquanto que a variante do alelo protetora apresenta um aumento significativo de 8°C na temperatura de *melting*. O protocolo inclui 4 passos: 1 - Desnaturação: desnaturação da amostra e desnaturação da enzima; 2 – *Cycling*: desnaturação da amostra e ativação da enzima; 3 – *Melting*: Análise da curva de *melting* para identificação do produto de PCR derivado do alvo e 4 – Arrefecimento.

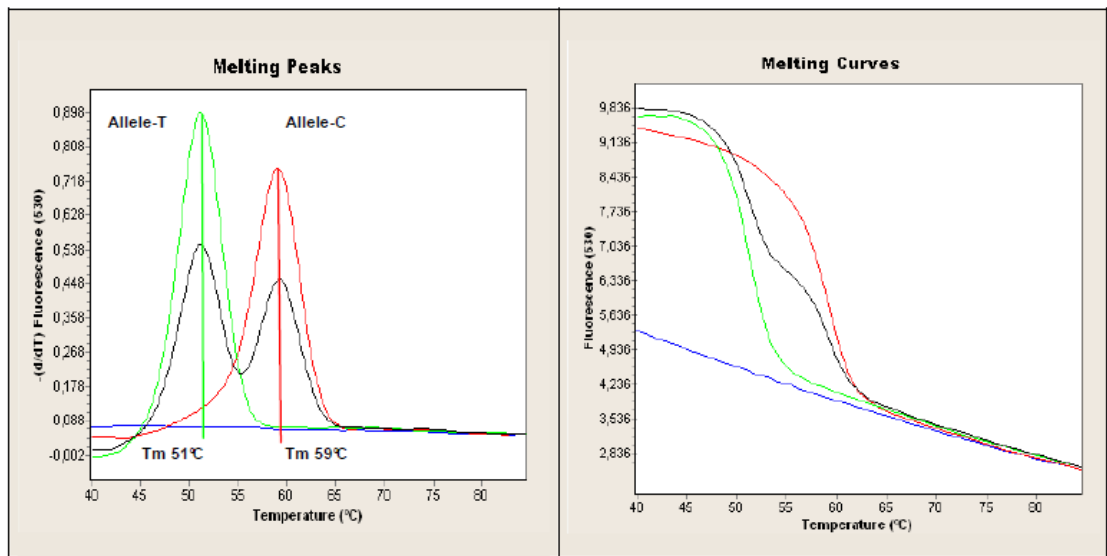


Figura 8 – Dados da amostra para a detecção do sistema *IL28B* (a imagem da direita apresenta os picos de *melting* no canal 530; a imagem da esquerda apresenta as curvas de *melting*) (adaptado de LightMix kit *IL28B*)

Os picos verdes representam a variante homozigótica (T/T), os pretos a variante heterozigótica (C/T) e os vermelhos a variante homozigótica (C/C).

5.3 Interferão lambda (IFN- λ)

Tem sido descrito que a expressão de elevado nível de ISGs intra-hepáticos afetam a resposta à terapêutica de PEG-IFN/RBV e estudos recentes revelaram uma associação entre o genótipo *IL28B* e os níveis de expressão dos ISGs intra-hepáticos (figura 9). Adicionalmente o sistema imune inato: o recetor *toll-like 3* e o gene I inducível do ácido retinóico que sinalizam as vias de indução do IFN- β têm um papel essencial na defesa antiviral do hospedeiro contra a infeção do VHC.

Asahina *et al.* em Matsuura *et al.*, 2014 demonstraram que as expressões dos genes intrahepáticos envolvendo a imunidade inata estão fortemente associadas com o

genótipo *IL28B* e a resposta a PEG-IFN/RBV. No que diz respeito à expressão da *IL28B* em PBMCs (células mononucleadas do sangue periférico), Suppiah *et al.*, e Matsuura *et al.*, demonstraram que era superior nos pacientes com genótipo favorável de *IL28B*. Estes autores demonstraram que a indução de vários ISGs nos PBMCs após a administração de PEG-IFN/RBV apresentava tendência para ser mais forte no grupo SVR que no NVR.

O IFN- α afeta diretamente a função das DCs (células dendríticas) e aumenta significativamente a produção de IFN- λ . Baseada nestes achados é tentador especular que o IFN- α exógeno possa aumentar a produção de IFN- λ por DCs e/ou hepatócitos infectados por VHC durante a terapêutica com IFN- α , e isto pode dar uma explicação potencial porque as variantes genéticas de *IL28B* prevêm o resultado da terapêutica de IFN- α .

Recentemente, Prokunina – Olsson *et al.* (2013) desenvolveram uma sequência de ARN em hepatócitos humanos primários ativados com ARN de dupla-cadeia que mimetizam a infecção de VHC. Estes autores descobriram que uma nova região induzida transitoriamente que continha uma variante dinucleotídica ss469415590 (TT ou Δ G) estava fortemente associada com a resolução do VHC. O polimorfismo ss469415590 está localizado a montante de *IL28B* e está em elevado enlace de desequilíbrio com rs12979860. O alelo ss469415590 Δ G é uma variante *frameshift* que cria um novo gene, designado IFNL4 codificando a proteína tipo III IFN λ 4, a qual é bastante similar a IFN- λ 3 (Prokunina - Olsson, *et al.*, 2013).

Comparado com *IL28B* SNP, o IFN- λ SNP está mais fortemente associado com a resolução do VHC nos indivíduos ancestrais Africanos, ainda que forneça informação comparável nos Europeus e Asiáticos. A cinética viral, especialmente a resposta na semana 4, tem um elevado valor preditivo, e a relevância de *IL28B* como marcador preditivo para o sucesso da terapia tripla com PEG-IFN/RBV/PI é menos significativo. Os mecanismos pelos quais IFN- λ s são ativos contra a infecção por VHC devem ser elucidados através de análises funcionais de IFN- λ s no futuro (Matsuura *et al.*, 2014). Estas afirmações encontram-se esquematizadas na figura 9.

Testar a *IL28B* pode ser útil para determinar a resposta a IFN e a probabilidade de atingir RVR com PEG-IFN/RBV antes de iniciar a terapêutica tripla com PEG-IFN/RBV mais um antiviral de ação direta, especialmente em países com orçamentos de saúde limitados. Marcadores preditivos adicionais estão também a ser avaliados, por exemplo, níveis séricos baixos de interferon γ de proteína 10 inducível (IP-10) associada

com SVR e podem melhorar o valor preditivo para discriminação entre SVR e não resposta (Prokunina - Olsson, *et al.*, 2013).

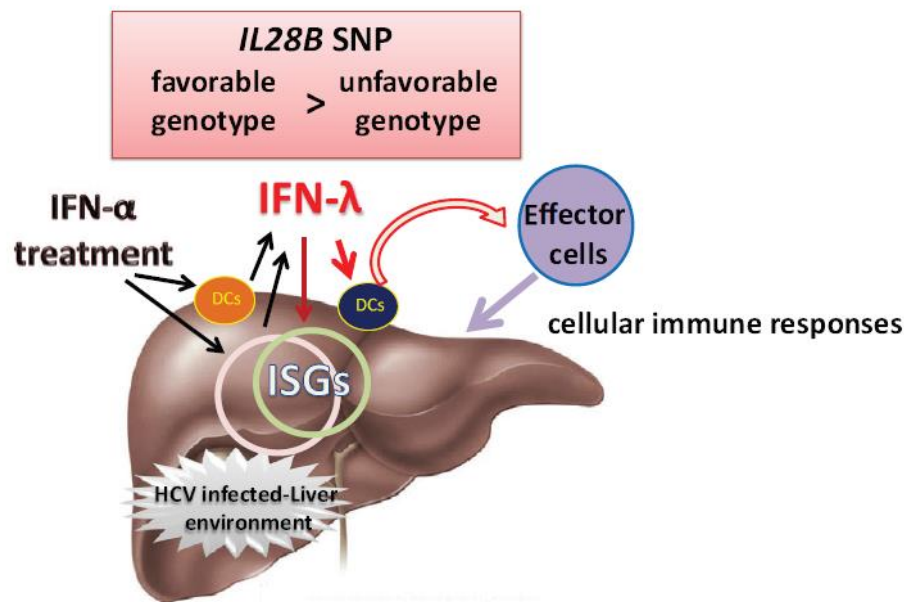


Figura 9 – Papel potencial do polimorfismo de nucleótido simples (SNP) Interleucina-28B (*IL28B*) na resposta à terapêutica com IFN-α (adaptado de Matsuura *et al.*, 2014)

6. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A elevada prevalência da infecção por VHC a nível mundial requer esforços renovados na prevenção primária incluindo o desenvolvimento da vacina, bem como novas abordagens à prevenção secundária e terciária para reduzir as complicações da doença hepática crónica e melhorar a qualidade de vida dos doentes já portadores de doença hepática.

A melhoria das taxas de SVR e a diminuição da incidência, quer do aparecimento de resistências, quer de complicações relacionadas com a toxicidade dos fármacos, pode passar pela definição das suas concentrações sanguíneas terapêuticas ótimas e das que estão relacionadas com um risco de dano elevado para os doentes por sobredosagem, para permitir o desenvolvimento de procedimentos de medida cujos resultados possam ajudar a ajustar, em tempo útil, as doses e os seus intervalos de administração.

Ainda que a evolução terapêutica tenha sido notável nos últimos anos o custo é e será inevitavelmente função da eficácia, sobretudo em países em que os recursos são limitados, e é fundamental uma gestão criteriosa das verbas públicas.

Em Portugal a estratégia nacional para controlo e erradicação da hepatite C terá de passar obrigatoriamente por um conjunto de medidas que conjugam coordenação de esforços, financiamento extraordinário, prevenção, acesso facilitado e aplicação de terapêuticas mais eficazes e toleráveis/seguras. E as recomendações terão por base as normas europeias cuja lista de prioridades serão a motivação do doente, estadio histológico, custo e disponibilidade.

Na generalidade serão fundamentais e necessárias a continuação de investigação e pesquisa intensas para determinar qual o esquema de tratamento ótimo em termos de segurança e eficácia para cada paciente individualmente, para o atingimento definitivo da erradicação do vírus da hepatite C.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afdhal, N. *et al.* (2014). Ledispavir and sofosbuvir for previously treated HCV genotype 1 infection”. *N Engl Journal of Medicine*; April 17, **370**, pp.1483-93.

Antaki, N., Craxi, A., Kamal, S., Moucari R.; Van der Merwe S.; Haffar, S. *et al.* (2010). The neglected hepatitis virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver Int*; **30**, pp.342-55.

Ascione, A., De Luca M, Tartaglione, MT *et al.* (2010). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin is more effective than peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treating chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*; **138**, pp.116-22. (Abstract).

Bae, Andrew S., Ku, S. Karin, Miller, Michael D., Mo, Hongmei and Svarovskaia, S. Evguenia. (2011). Allele-specific Real - Time PCR System for detection of Subpopulations of genotype 1a and 1b Hepatitis C NS5B Y448H Mutant Viruses in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept, pp.3168-74.

Barritt, A.S., Fried, M.W. (2012). Maximizing opportunities and avoiding mistakes in triple therapy for hepatitis C virus. *Gastroenterology*, 14. **(6)**, pp.122-3.

Bertoletti, A., Ferrari, C. (2003). Kinetics of the Immune Response during HBV e HCV Infection. Concise Review in Mechanisms of Disease – *Hepatology*, July, **38**, pp.:4-13.

Bizollon T., Ahmed S.N.S., Guichard S., Chevallier P., Adham M., Ducerf C., Baulieux J., Trepo C. (2000). Anti-hepatitis C virus core IgM antibodies correlate with hepatitis C recurrence and its severity in liver transplant patients. *Gut*. **47**, pp.698 – 702.

Boesecke, Christoph, Mauss Stefan, Rockstroh, Jürgen Kurt: (2014). Management of HCV/HIV coinfection. *Hepatology*, pp.307-326; 338-356.

Boesecke, C., Rockstroh, JK. (2011). Treatment of acute hepatitis C infection in HIV-infected patients. *Curr Opin HIV AIDS*.; **(6)**, pp.278-84.

Boesecke C, Wedemeyer H, Rockstroh JK. (2012). Diagnosis and treatment of acute hepatitis C virus infection. *Infect Dis Clin North Am.* Dec;26 (4), pp.995-1010.

Böhlig, Albrecht, Puchner, Karl-Philipps, Berg, Thomas. (2014). Extrahepatic manifestations of chronic HCV. *Hepatology* , pp.307-26.

Casey, L. C., Lee, W. M..(2013). Hepatitis C Virus Therapy Update. *Curr Opin Gastroenterol.* 29 (3), pp.243-49.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. Morbidity and Mortality Weekly Report [disponível em (<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/RR/RR4719.pdf>) consulta 2015-06-06.]

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2011). Sexual transmission of hepatitis C virus among HIV-infected men who have sex with men--New York City, 2005-2010.

Chu CJ, Lee SD. (2008). Hepatitis B virus/hepatitis C virus coinfection: epidemiology, clinical features, viral interactions and treatment. *J Gastroenterol Hepatol*; **23**, pp.512-20.

Clemens J.M., Taskar S., Chau K., Vallari D., Shih J. W-K. Alter H.J., Schleicher J.B., Mimms L.T. (1992). IgM Antibody Response in Acute Hepatitis C Viral Infection. *Blood.* **79**(1), pp.169-72.

Coppola, N., Marrone A., Pisaturo, M., Starace, M., Signoriello, G., Gentile, I., Adinolfi, L.E., Sagnelli, E., Zampino. (2014). Role of interleukin 28-B in the spontaneous and treatment-related clearance of HCV infection in patients with chronic HBV/HCV dual infection. *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis.* Abstract.

Cornberg M., Razavi H., Alberti A., Bernasconi E., Buti M. Cooper C. *et al.* (2011). A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel". *Liver Int*; **31**, pp.30-60.

Dienstag, J.L.. *Chronic Hepatitis*. Chap **306**, pp 2567-2588.

Dong, B.J. (2000). How medications affect thyroid function. *West Journal of Medicine*, **172**, pp.102-6.

Dubuisson, J., Helle, F. e Coquerel, L. (2008) Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cellular Microbiology*, **10**(4), pp. 821-7.

Dufour, Lott, Nolte, Gretch; Koff, Seeff (2011) NACB: Laboratory Guidelines for Screening Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice (NACB) 1-78 [disponível em (<https://www.aacc.org/~media/practiceguidelines/hepaticinjury/hepaticcombined2010.pdf?la=en>) consulta em 06-06-2015].

Fonseca – Coronado, Salvador, Escobar – Gutiérrez, Alejandro, Ruiz – Tovar, Karina; Cruz – Riviera, Mayra Yolanda, Rivera – Osorio, Pilar, Vasquez – Pichardo, Mauricio, Carpio – Pedroza, Juan Carlos, Ruíz-Pacheco, Juan Alberto, Cazares, Fernando and Vaughan, Gilberto. (2011). Specific Detection of Naturally Occurring Hepatitis C Virus Mutants with Resistance to Telaprevir and Boceprevir (Protease Inhibitors) among Treatment – Naïve Infected Individuals. *Journal of Clinical Microbiology*, pp.281–87.

Everson, Gregory T., Dusheiko, Geoffrey, Coakley, Eoin, Shafran, Stephen D., Zoulim, Fabien; Diago, Moises, Freilich, Bradley, Ravinuthala, Ravi; Norris, Suzanne, Xiong, Norris, Junyuan J., Trinh, Roger; Baykal, Tolga, Luo, Yan, Sulkowski, Mark S.(2014). Integrated Efficacy Analysis of Four Phase 3 Studies in HCV Genotype 1a-Infected Patients Treated with ABT- 450/r/Ombitasvir and Dasabuvir With or Without Ribavirin. AASLD 2014. Abstract 83.

Fabrizi F, Lunghi G, Messa P, Martin P. (2008). Therapy of hepatitis C virus-associated glomerulonephritis: current approaches. *J Nephrol*. **21**, pp.813-25.

Ferenci, P., Asselah, T.; Foster, G. *et al.* (2013). Faldaprevir plus pegylated interferon alfa-2a and ribavirin in chronic HCV genotype 1 treatment naive patients: final results

from STARTVerso1, a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial. *J Hepatol.* **58**, pp.569-70.

Flamm, S.L., Lawitz E.; Jacobson, I. *et al.* (2013). Boceprevir with peginterferon alfa-2-a-ribavirin is effective for previously treated chronic hepatitis C genotype 1 infection. *Clinical Gastroenterology. Hepatology.***11**, pp.81-7.

Flamm, Steven L., Gane, Edward J., DuFour, Jean-Francois J., Rustgi, Vinod; Bain, Vincent G., Crawford, Darrell H., Andreone, Pietro, Hassanein, Tarek, Mazur, Wlodzimierz W., Lovell, Sandra S., Da Silva-Tillmann, Barbara, Shulman, Nancy; Puoti, Massimo, D. Box, Terry; Jacobson, Ira M. (2014). Safety of ABT-450/r/Ombitasvir + Dasabuvir With or Without Ribavirin in HCV Genotype 1-infected Patients 65 Years of Age: Results From Phase 2 and 3 Trials. AASLD 2014. Abstract 1969.

Folheto informativo LightMix® Kit IL28B (ROCHE).

Fried MW, Buti M, Dore GJ, *et al.* (2013). Once-daily simeprevir (TMC435) with pegylated interferon and ribavirin in treatment-naïve genotype 1 hepatitis C: The randomized PILLAR study. *Hepatology.* **58** (6), pp.1918-29.

Fried, Michael W, Xavier, Forns, Nancy, Reau; Heiner, Wedemeyer, Mitchell, L. Shiffman, Angeles, Castro, David, J. Mutimer, Samuel, S. Lee, Roger, Trinh, Sandra, S. Lovell, Leticia, Canizaro, Marcos, Pedrosa, Thomas, Berg. TURQUOISE-II: (2014) Regimens of ABT-450/r/Ombitasvir and Dasabuvir With Ribavirin Achieve High SVR12 Rates in HCV Genotype 1 - Infected Patients with Cirrhosis, Regardless of Baseline Characteristics. AASLD. Abstract 81.

Gentile, I., Borgia, F. Coppola N., Buonomo AR, Castaldo G., Borgia, G. (2014). Daclatasvir: the first of a new class of drugs targeted against hepatitis C virus NS5A. *Curr Med Chem.* Abstract.

Gentile, I.; Buonomo, AR., Borgia, F., Castaldo G., Borgia G. (2014). Ledispavir: a novel synthetic antiviral for the treatment of HCV infection. Abstract.

Gentile I., Buonomo, A.R., Zappulo, E., Castaldo G.; Borgia, G. (2014). MK-5172: a second- generation protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection. *Expert Opin Investig Drugs*. Jul23, **(7)**, pp.1049. Abstract.

Gentile I., Buonomo, A.R., Zappulo, E., Minei, G, Morisco, F., Borrelli, Coppola N., and Borgia, G. (2014). Asunaprevir, a protease inhibitor for the treatment of hepatitis C infection. *Ther Clin Risk Manag* 2014; Jun 26, **10**, pp.493-504.

Gentile, Ivan, R. Buonomo, Antonio, Borgia, Guglielmo (2014). Dasabuvir: a Non-Nucleoside Inhibitor of NS5B for the treatment of Hepatitis C virus infection. Volume 9, Number 2, June **(9)**, pp. 115-23.

Giordano TP, Kramer JR, Soucek J, Richardson P, El-Serag HB. (2004). Cirrhosis and hepatocellular carcinoma in HIV-infected veterans with and without the hepatitis C virus: a cohort study, 1992-2001. *Arch Intern Med*.**164**, pp.2349-54.

Hanafiah, Khayriyyah Mohd, Groeger, Justina, Flaxman, Abraham D. and Steven T. (2013) *Wiersma - Global Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection: New Estimates of Age Specific Antibody to HCV Seroprevalence*.

Jacobson, IM., Marcellin, P, Zeuzem S. *et al.* (2012). Refinement of stopping rules during treatment of hepatitis C genotype 1 infection with boceprevir and peginterferon/ribavirin. *Hepatology*. **56**, pp. 567-75.

Jacobson, Ira M., DuFour, Jean-Francois J., Enejosa, Jeffrey; J. de Knegt, Robe; Ferenci, Peter, Reynaert, Hendrik, M. Di Bisceglie, Adrian, Larsen, Lois; Baykal, Tolga, Rodrigues-Jr, Lino, Podsadecki, Thomas, Jensen, Donald M., Poordad, Fred. (2014). SVR12 Rate of 95.7% in 209 HCV Genotype 1-Infected Null Responders Treated With ABT-450/r/Ombitasvir and Dasabuvir With or Without Ribavirin. AASLD. Abstract 1934.

Jennings, TA., Chen, Y., Sikora D., *et al.*. (2008). RNA unwinding activity of the hepatitis C virus NS3 helicase is modulated by the NS5B polymerase. *Biochemistry*. **47**, pp.1126-35.

Jensen *et al.* DM. (2013). A pooled analysis of two randomized, double-blind placebo-controlled Phase III trials (STARTVerso1&2) of faldaprevir plus pegylated interferon alfa-2a and ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C genotype-1 infection. *Hepatology*, **58**, pp.734A–735A..

Jones, CT., Murray, CL., Eastman, DK *et al.*, (2007). Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol*. **81**, pp8374-83.

Kamili, Saleem, Jan Drobeniuc, Araujo, Aufra C. and Hayden, Tonya M. (2012). *Laboratory Diagnostics for Hepatitis C Virus Infection*.

Kanda, Tatsuo, Nakamoto, Shingo, Shuang Wu and Yokosuka. (2014). New treatments for genotype 1 chronic hepatitis C - focus on simeprevir. *Ther Clin Risk Manag.*, **10**, pp.387-94.

KDIGO (2013) Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Official Journal of the International Society of Nephrology*.; **3(1)**, pp.163

[disponível em

(http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf) consulta em 2015-06-06].

Kim, Arthur Y., Onofrey, Shauna and, Church, Daniel R. (2013). An Epidemiologic Update on Hepatitis C Infection in Persons Living With or at Risk of HIV Infection.

Lawitz, E., Mangia A., Wyles D. *et al.* (2013). Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection. *N.Engl J Med*. **368**, pp.1878-87.

Lenz, O., Berk, Kock, J.M., H.D., Remoortere, P.V.; Nyanguile, O.; Vende ville, S., Jonckers, T., Raboisson, P., Simmen, K., Fanning, G. e Lin, T. (2010). Combination of

TMC 435 with two novel NS5B inhibitors increases anti-HCV activity and results in a higher genetic barrier *in vitro*. European Association for the Study of Liver. Poster 759.

Lin, T., Devogelaere, B., Lenz, O. (2008). Inhibitory activity of TMC435350 on HCV NS3/4A proteases from genotypes 1 to 6. American Association for the study of Liver Diseases, poster 1912.

Management of Hepatitis C and HIV Coinfection. Clinical Protocol for the WHO European Region.

Matsuura, Kentaro, Watanabe, Tsunamasa, Yasuhito, Tanaka. (2014). Role of *IL28B* for Chronic Hepatitis C Treatment Toward Personalized Medicine. *J. Gastroenterol Hepatol.* 29(2), pp. 241-49.

Mauss, Berg, Rockstroh, Sarrazin, Wedemeyer. (2014). *Hepatology a clinical textbook* Edition 2014. Chapter 11, 12 e 13, 18, 19. Flying Publisher.

McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, *et al.* (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med.*, **339**, pp.1485-92.

Moreno, C., Berg, T., Tanwandee, T., Thongsawat, S., Van Vlierberghe, H., Zeuzem, S., Lenz, O., Peters, M., Sekar, V., De Smedt, G. (2012). Antiviral activity of TMC435 monotherapy in patients infected with HCV genotypes 2-6: TMC 435-C202, a phase IIa, open label study. *J.Hepatol.*, **56**(6), pp.1247-53.

Nelson D., Poordad F., Feld J., *et al.* (2013). High SVR rates (SVR4) for 12 week total telaprevir combination therapy in *IL28B* CC treatment- naïves and prior relapsers with G1 chronic hepatitis C: CONCISE interim analysis. *Hepatology* **58**. Abstract 881.

Nelson, D.R., Lawitz; E. Bain; V., Gitlin N., Hawkins, T., Marotta; P., Workowski, K., Flamm, S., Pang, P.S., McHutchinson, J.G. McNally, J., Urbanek, P., Yoshida, E.M. (2012). 12 high SVR12 with 16 weeks of Tegobuvir and GS-9256 with Peginterferon

–alfa 2A and ribavirin in treatment-naïve genotype 1 HCV patients. *J Hepatol.*, **56**, pp. 6-7.

Nizar, N. Zein (2003). The epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection.

Normas de Orientação Clínica da EASL: (2013). Abordagem da Infecção pelo Vírus da Hepatite C – Associação Europeia para o Estudo do Fígado. *Journal of Hepatology*, vol **XXX**.

Opravil M, Sasadeusz J, Cooper DA, *et al.* (2008). Effect of baseline CD4 cell count on the efficacy and safety of peg-interferon-a 2a (40 kd) + ribavirin in patients with HIV-HCV coinfection. *J Acquir Immune Def Syndr*, **47**, pp.36-49. Abstract.

Pawlotsky, JeanMichel, Aghemo, Alessio, Dusheiko, Geoffrey; Forns, Xavier; Puoti, Massimo, Sarrazin, Christophe. (2014). EASL European Association for the Study of the Liver Recommendations on Treatment of Hepatitis C.

Pellicelli, Adriano M., Montalbano, Marzia, Lionetti Raffaella, Durand, Christine, Ferenci, Peter, D'Offizi, Gianpiero, Knop, Viola, Telese, Andrea, Lenci, Ilaria, Andreoli, Arnaldo, Zeuzem, Stefan, Angelico, Mario. (2014). Sofosbuvir plus Daclatasvir for pos-transplant recurrent hepatitis C: Potent antiviral activity but no clinical benefit if treatment is given late. Elsevier.

Pimentel, R. A. (1999). Bases para o Diagnóstico Laboratorial das Doenças Infecciosas: Métodos Imunológicos e de Biologia Molecular. Clínica Médica e Diagnóstico Dr Joaquim Chaves, pp. 131-36.

Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A. Moradpour, Pawlotsky J.-M. (2004). Structural biology of hepatitis C vírus. *Hepatology*, **39** (1), pp5-19.

Prokunina-Olsson L., Muchmore B.; Tang, W. *et al.* (2013). A variant upstream of IFNL3 (*IL28B*) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat. Genet.* **45**, pp.164–71.

Qiao, Jinjuan, Yu, Junping, Yang, Hang, Wei, Honping. (2014). PCR. Based *In Vitro* Synthesis of Hepatitis C Virus NS3 Protease for Rapid Phenotypic Resistance Testing of Protease Inhibitors. *Journal of Clinical Microbiology*, April. Volume 52, Number 4, pp.1139-45.

Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C [Disponível em (<http://www.hcvguidelines.org>) consulta em 2015-06-06].

Representação clínicolaboratorial da hepatite C aguda: Dinâmica da replicação do vírus da hepatite C na infecção aguda e Representação clínicolaboratorial da hepatite C crônica.

[Disponível em (<http://depts.washington.edu/hepstudy/hepC/clindx/acute/discussion.html>) consulta em 2015-06-06].

Resumo das Características do Medicamento Incivo (Telaprevir) (2011). European Medicines Agency.

Rice, C.M. (2011). New insights into HCV replication: potential antiviral targets. *To Antivir Med.*, 19(3): 117-20.

Rockstroh J, Grint D, Boesecke C, *et al.* (2012). Increases in acute hepatitis C (HCV) incidence across Europe: which regions and patient groups are affected? *J Int AIDS, Soc.* Nov (6), pp.11-15.

Rodriguez-Torres, Maribel, Yoshida, Eric M., Marcellin, Patrick, Srinivasan, Subasree; Puhorit, Vivek S., Wang, Cunshan, Hammond, Jennifer L. (2014). A phase 2 study of filibuvir in combination with pegylated IFN alfa and ribavirin for chronic HCV. *Annals of Hepatology*, Vol. 13 No 4, pp364-75.

Sagnelli, E., Coppola, N., Messina, V. *et al.* (2002). HBV superinfection in hepatitis C virus chronic carriers, viral interaction, and clinical course. *Hepatology*, 36, pp1285-91.

Sarrazin, C., Zeuzem, S. (2010). Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, **138**, pp.447-62.

Schwarze-Zander; Carolynne, Rockstroh, Jürgen Kurt. (2014). HBV/HCV coinfection". *Hepatology*. pp. 357-65

Shaefer, Martin, Mauss, Stefan. (2014). Management of adverse drug reactions. *Hepatology*, pp. 293-306.

Shoenfeld, Yehuda, Cervera, Ricard Gershwin, M. Eric.(2013). *Diagnostic criteria in autoimmune diseases*. Humana Press, Chapter 27.

Resumo das Caraterísticas do Medicamento Sovaldi (Sofosbuvir) (2013). European Medicines Agency.

Soto B, Sanchez-Quijano A, Rodrigo L, *et al.* (1997). Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol*, **26**, pp.1-5.

Sulkowski, Mark S., Gardiner, David F., Rodriguez-Torres, Maribel, Reddy Rajender K., Hassanein, Tarek, Jacobson, Ira, Lawitz, Eric, Lok, Anna S., Hinestrosa, Federico, Thuluvath, Paul J., Schwartz, Howard, Nelson, David R., Everson, Gregory T., Eley, Timothy, Wind-Rotolo, Megan, Huang Shu-Pang, Gao, Min, Hernandez, Dennis, McPhee, Fiona, Sherman, Diane, Hindes, Robert, Symmonds, William, Pasquinelli, Claudio, Grasela, Dennis M. (2014) Daclatasvir plus Sofosbuvir for previously treated or untreated chronic HCV infection. April. *J Hepatol*,.

Suppiah V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G. *et al.* (2014). *IL28B* is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*.

Svarovskaia, Evguenia S., Martin, Ross, McHutchison, John, G., Miller, D. Michael, Mo, Hongmei. (2012) Abundant Drug Resistant NS3 Mutants Detected by Deep Sequencing in Hepatitis C Virus-Infected Patients Undergoing NS3 Protease Inhibitor Monotherapy. *Journal of Clinical Microbiology*, Volume 50, Number **10**, pp.3267-74.

Svarovskaia E, Svory-Sobol H, Gontcharova V, *et al.* (2012). Comprehensive resistance testing in patients who experienced relapse after treatment with sofosbuvir (GS-7977) containing regimens in phase 2 studies. *Hepatology*, pp.56-551.

Van der Meer AJ, Veldt BJ., Feld JJ, *et al.* (2012). Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA*, **308**, pp.2584-93.

Velosa, J., Caldeira, L., Lopes, A. I., Guerreiro, L. e Marinho, R. (2012) Recomendações para a terapêutica da hepatite C. *Jornal Português de Gastroenterologia*. **19**(3), pp. 133-9.

Vermehren, J., Aghemo, A., Falconer, K. *et al.* (2014). Clinical significance of residual viremia detected by two real-time PCR assays for response-guided therapy of HCV genotype 1 infection. *J. Hepatol.*

Resumo das Características do Medicamento Victrelis (Boceprevir) (2011). European Medicines Agency.

Vogel M., Rockstroh JK. Liver disease: the effects of HIV and antiretroviral therapy and the implications for early antiretroviral therapy initiation. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009 May; **4**(3), pp.171-5.

Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Uigin D., Kidd J., Kidd K, Khakoo SI, Alexander G., Goedert JJ., Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG., Goldstein DB, Carrington M. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Carrington M. Nature*, **461**,(7165), pp.798-801.

Thompson, J. Richard, and Lee, J. (2014) The price of Progress in Hepatitis C Management Published Online: October 23.

Wedemeyer, Heiner. (2014). Hepatitis D – diagnosis and treatment. *Hepatology*, pp.177-95

WHO: Hepatitis C. Global Alert and Response (GAR). (2003). [Disponível em (<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2003/en/index3.html>) consulta em 2015.02.01].

Wyles, DL., Rodriguez-Torres, M., Lawitz, E. *et al.* (2014). All-Oral Combination of Ledipasvir, Velpatasvir, Tenofovir, and Ribavirin in Treatment-Naive Patients with Genotype 1 HCV Infection. *Hepatology*. February 5.

Zeuzem, S., Berg, T., Gane, E. *et al.* (2014). Simeprevir Increases Rate of Sustained Virologic Response Among Treatment-Experienced Patients With HCV Genotype-1 Infection: A Phase IIb Trial. *Gastroenterology*, **146**, pp.430-41. Abstract

V Curso de Hepatites Víricas. (2014). Centro Hospitalar de Lisboa Norte e Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. Lisboa, Outubro.

VII Workshop Internacional de Atualização em Hepatologia. (2014). Perspectivas Futuras no tratamento da Hepatite C. Curitiba, Agosto. [Disponível em (<http://www.hc.ufpr.br/?q=content/vii-workshop-internacional-de-atualizacao-em-hepatologia-0>) consulta em 2105. 02.01].